

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**Estudio del mecanismo de muerte
asociado a la terapia antitumoral
linamarasa/linamarina/glucosa oxidasa**

Ricardo Gargini
Madrid 2009

Memoria de investigación presentada por
Ricardo Antonio Gargini para optar al grado de
Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por la
Dra. Marta Izquierdo Rojo
Catedrática del Departamento de Biología Molecular
de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

Ricardo Antonio Gargini ha recibido financiación del Programa de becas de alto nivel de la Unión Europea para América Latina, Programa Alban así como también de la Fundación Mario Losantos del Campo.

Esta tesis es dedicada
a Vega, eres todo lo que necesito
para ser feliz, gracias

AGRADECIMIENTOS, y algo más

Primero que nada, con el permiso de los lectores, esta parte de la tesis la escribo en argentino... son muchos años y esa tierra tira mucho.

Hace tiempo que esto empezó y, como es de esperar, hay mucha gente a la que me gustaría agradecer. Primero que nada a Marta, que me dio la oportunidad de hacer esta tesis y por ser una jefa y una amiga a la vez.

Bueno, hoy llevo 15 años y 7 meses lejos de mi familia, pero se supone que es por algo importante, todavía no lo sé, que vale tanto? Es que no puedo sólo agradecer a mis padres, ya que son ellos los responsables de esto y me imagino que no seré capaz nunca de darles lo que ellos me dan a mí. Hay muchas cosas que no se pueden explicar con palabras, que sólo se reflejan cuando los puedo abrazar, GRACIAS VIEJOS!!! Esto es para el viejo, sin tus consejos no creo que pudiera haber llegado a donde he llegado, sos la persona más grande del mundo. También quiero agradecer a la vieja, que sino se va enojar, vos sabés lo importante que sos, te lo dije muchísimas veces y siempre te lo voy a recordar, gracias por ser como sos, la mejor madre del mundo, ahora... sí que me has hecho un poco blandito. Quiero agradecer en particular a mi abuelo Alvaro, siempre pienso en vos, gracias. "Al Rojo", "Rojito" gracias por haberme apoyado, ayudado y hasta cuando me bancaste para que pudiera terminar mi carrera, todo es parte de esto, son mil cosas. "Al Enano", te quiero, gracias por estar ahí, aunque no lo creas...

Y bueno, en especial a la mujer más linda del mundo, esto también es tuyo desde el principio al fin, gracias por soportar al argentino más pesado del planeta. Acá tengo que agradecer a la ciencia, que a pesar de que tiene tantos reveses, si no fuera por las eternas cinéticas, no te habría conocido, gordita!!!

A todos los compañeros, que son muchos, en especial a Irene, por haberme divertido, enloquecido y más. A Jon, vamos que queda poco! Son muchas las charlas que hemos tenido en las que hemos aprendido los dos cosas de ambos. A todos los chicos, a Marina, a María, a Cris, a Bea, a Paloma, a Willie y a Alejandro. Quiero agradecer en especial a Gloria, "al Chirli", "al Alfred" y "al Maiquel", gracias por la combinación de poca ciencia, muchas cervezas, las alitas "de conejo" y el grifo. A Walti, las vueltas de la vida siempre nos cruzan... a ver que nos depara el futuro.

A la gente que ha trabajado a mi lado, en especial a Nuria, sos la mejor ya sólo por soportarme, "al hombre-flama", a Mario y a Eva, cuanto les habré dado la vara.

A Paula y a Laura, gracias por barrerme los pies (aún así voy a casarme) y dejarme que les pise todo lo mojado. Espero poder seguir deleitándonos con muchas tartas más.

Esto va poco de ciencia, pero tengo que agradecer a Paco y Javier, por las miles de

consultas y ,en especial, a Paco por darle continuidad a esto, es un honor para mí que este camino lo pueda seguir recorriendo con vos.

A Juan Pablo, sí que hemos hecho ciencia!... cuantas horas le dedicamos, somos unos tarados, que en esto no se pagan las horas extras!!! Te mereces lo mejor, sos una máquina.

Quiero darle las gracias, a mi amigo Martín y a Cande por todos estos años siempre a mi lado.

A toda la gente del Centro, son grandes personas, los servicios son los mejores, a Alfonso, a Maria Ángeles, a Valentina, a Juancito, a Berta, a Carlos y a Javier que nunca te dicen que no y mira que siempre tenemos prisa...

También tengo que agradecer a Ramón, a María José, a Juan y a Pablo, gracias por dejarme ser parte de vuestra familia, eso ha hecho todo más fácil.

A todas las personas que me han ayudado y me han hecho crecer que, en definitiva, esto es para eso, para aprender...

índice

Abreviaturas y Acrónimos.....	1
Summary.....	3
Introducción.....	5
Muerte celular programada.....	5
Necrosis.....	5
Apoptosis.....	9
Muerte independiente de caspasas.....	14
CÁNCER.....	16
Sistema <i>lis/lin/GO</i>	18
Implicación de la muerte celular en la carcinogénesis.....	18
Autofagia.....	20
Autofagia, un mecanismo de muerte celular muy eficiente.....	22
Mitofagia: Reciclando la mitocondria, un juego entre la vida y la muerte.....	23
Tumorigénesis y autofagia: un equilibrio de muerte.....	24
Objetivos.....	25
Materiales y Métodos.....	27
Reactivos especiales.....	27
Anticuerpos.....	27
Plásmidos.....	28
<i>Construcciones de RNA de interferencia</i>	30
Vectores virales.....	30
<i>Adenovirus</i>	30
<i>Lentivirus</i>	30
<i>Retrovirus</i>	31
Cultivos celulares.....	31
<i>Medios y condiciones de cultivo</i>	31
<i>Células</i>	31
<i>Obtención de cultivos primarios de explantes de tumores</i>	33
Transfección de células.....	33
Determinación de la supervivencia celular.....	33

Infección con adenovirus <i>in vitro</i>	34
Inmunofluorescencias.....	34
Análisis de las modificaciones estructurales de la mitocondria	34
Marcaje de autofagosomas.....	35
Medición de estrés oxidativo.....	35
Medición del potencial de membrana.....	35
Análisis del tipo de muerte por citometría de flujo (Anexina V-FITC/IP o Anexina V-PE/7-AAD).....	36
Ensayo de formación de colonias.....	36
Proteínas.....	36
<i>Obtención de extractos de proteínas totales</i>	36
<i>Preparación de fracciones enriquecidas citosólicas y mitocondriales</i>	37
<i>Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)</i>	37
Tratamiento de los ratones.....	37
Análisis estadístico de los datos.....	38
Resultados.....	39
El sistema linamarasa/linamarina/glucosa oxidasa genera una rápida y eficiente muerte de las células tumorales.....	39
Caracterización morfológica de la muerte inducida por el sistema combinado <i>lis/lin/GO</i>	44
Análisis de los mecanismos moleculares en la muerte celular inducida por daño mitocondrial en combinación con estrés oxidativo.....	49
La combinación de cianuro con peróxido de hidrógeno mata a las células tumorales U-87 MG dañando las mitocondrias sin activar la caspasas y sin participación de AIF.....	55
La generación de daño mitocondrial agudo en combinación con estrés oxidativo es un potente inductor de autofagia.....	58
<i>Daño mitocondrial, estrés oxidativo y proteínas de estrés</i>	58
<i>Participación de las vacuolas autofágicas en la muerte generada por el sistema <i>lis/lin/GO</i></i>	61
<i>Participación de los lisosomas en la fase degradativa de la muerte por autofagia</i>	68
<i>Inducción de muerte por autofagia in vivo en un modelo de xenotransplante de</i>	

<i>tumores humanos</i>	70
<i>Estudio de proteínas implicadas en el mecanismo de autofagia</i>	71
Estrecha relación entre apoptosis y autofagia: el bloqueo de los mecanismos de generación de autofagia facilita la activación de apoptosis y viceversa.....	72
La transformación tumoral sensibiliza a las células a morir por autofagia demostrando su potencial terapéutico.....	75
Discusión.....	79
Capacidad citotóxica y terapéutica del sistema <i>lis/lin/GO</i>	79
Cambio entre pérdida o mantenimiento de la integridad de membrana plasmática.....	81
Lisosomas: ¿Es Hsp70 un protector universal de la muerte celular?.....	82
El papel de la mitocondria en la muerte desencadenada por el sistema <i>lis/lin/GO</i>	83
Autofagia, mitofagia y muerte celular.....	87
Autofagia, apoptosis y tumorigénesis desencadenada por oncogenes.....	89
Conclusiones.....	93
Bibliografía.....	95
Anexo.....	112
Glioma regression in vitro and in vivo by a suicide combined treatment	
Autophagy induction as an efficient strategy to eradicate tumors	
Mre11 inhibition by oncolytic adenovirus associates with autophagy and underlies synergy with ionizing radiation	
Synergistic effect between a cyanogenic system and another oxidative inducer for the treatment of tumours	

abreviaturas y acrónimos

7-AAD	7-amino-actinomicina D
adenolis	adenovirus que codifica el gen de la linamarasa
AIF	factor inductor de apoptosis, del inglés <i>apoptosis inducing factor</i>
AMPK	quinasa activada por AMP alfa, del inglés <i>AMP activated kinase alpha</i>
ANT	translocador de nucleótidos de adenina, del inglés <i>adenine nucleotide translocator</i>
APAF-1	factor1 activador de proteasa apoptótica, del inglés <i>apoptotic protease activating factor1</i>
As₂O₃	trióxido de arsénico
Atg	gen relativo a autofagia, del inglés <i>autophagy related gene</i>
ATP	adenosina 5 trifosfato, del inglés <i>adenosine 5-triphosphate</i>
Bafi	bafilomicina
BIR	repeticiones IAP de baculovirus, del inglés <i>baculovirus IAP repeats</i>
BNIP3	proteína de interacción con BCL2/adenovirus E1B 19kDa
caFoxO3	FoxO3 constitutivamente activo
CsA	Ciclosporina A
CMV	citomegalovirus, del inglés <i>cytomegalovirus</i>
CNK	cianuro de potasio
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco, del inglés <i>Dulbecco modified Eagle's medium</i>
DIQ	1,5-isoquinolinediol
DRP1	proteína 1 relacionada con la dinamina, del inglés <i>dynammin-related protein 1</i>
dnFoxO3	dominante negativo de FoxO3
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético, del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	factor de crecimiento epidérmico, del inglés <i>epidermal growth factor</i>
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil eter) tetraacético, del inglés <i>ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether) tetraacetic acid</i>
EIM	espacio intermembrana
EndoG	Endonucleasa G
env	genes de la envuelta de los retrovirus, del inglés <i>envelope</i>
Eto	etopósido
FITC	isotiocianato de fluoresceína, del inglés <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FoxO	factor de transcripción Forkhead, del inglés <i>Forkhead transcription factor (FoxO)</i>
gag	genes de la cápsida del retrovirus, del inglés <i>group specific antigen</i>
GFP	proteína verde fluorescente, del inglés <i>green fluorescent protein</i>
GO	glucosa oxidasa
HAX-1	proteína X-1 asociada a HS1, del inglés <i>HS1-associated protein X-1</i>
2-HE	2-hidroxietidio
HMGB1	Caja 1 grupo de alta movilidad, del inglés <i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
Hsp70	proteína de choque térmico 70, del inglés <i>heat shock protein 70</i>
HtrA2	proteína A2 que se requiere para altas temperaturas, del inglés <i>high-temperature requirement protein A2</i>
IAP	inhibidor de apoptosis, del inglés <i>inhibitor of apoptosis</i>
ICAD	inhibidor de CAD
IP	yoduro de propidio

lin	linamarina
lis	linamarasa
LC-3	Cadena ligera 3, del inglés <i>Ligth Chain 3</i>
LMP	permeabilización de la membrana de los lisosomas, del inglés <i>lisosomal membrane permeabilization</i>
3MeA	3-Metiladenina
MEF	fibroblastos embrionarios de ratón, de inglés <i>murine embryonic fibroblast</i>
MEM	medio mínimo esencial, del inglés <i>minimum essential medium</i>
MME	membrana mitocondrial externa
MMI	membrana mitocondrial interna
MnSOD	superóxido dismutasa
MOI	Multiplicidad de infección, del inglés <i>Mutiplicity of infection</i>
MOMP	permeabilización de la membrana externa mitocondrial, del inglés <i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazo-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
NAC	N-acetil-L-cisteína
NEC-1	Necrostatina 1
neo	amoinolucósido 3' fosfotransferasa
NH₄Cl	Cloruro de amonio
pac	N-acetil transferasa de puomicina, del inglés <i>puomycin N-acetil transferase</i>
PARP-1	polimerasa de poli[ADP-Ribosa], del ingles <i>Poly[ADP-Ribose] polimerase</i>
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffer saline</i>
PE	ficoeritrina, del inglés <i>phycoerythrin</i>
PI-3K	fosfoinositidil 3-OH quinasa, del inglés <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PGK	quinasa de fosfoglicerato, del inglés <i>phophoglycerate kinase</i>
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
pRB	proteína del retinoblastoma
PTP	poro de transición de la permeabilización, del inglés <i>permeability transition pore</i>
RE	retículo endoplásmico
RNAi	RNA de interferencia
ROS	especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxigen species</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio, del inglés <i>sodium dodecil sulfate</i>
STS	estaurosporina
SV40	virus 40 de simios, del inglés <i>simian virus 40</i>
tBid	Bid truncado, del inglés <i>truncated Bid</i>
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral, del inglés <i>tumour necrosis factor</i>
UE	unidades enzimáticas
UV	Radiación ultravioleta
VDAC	canal de aniones dependiente de voltaje, del inglés <i>voltaje-dependent anion chanel</i>
VEGF	factor de crecimiento endotelial, del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>
VSVG	proteína G del virus de la estomatitis vesicular, del inglés <i>vesicular stomatitis virus protein G</i>
XIAP	inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X, del inglés <i>X chromosome-linked inhibitor of apoptosis</i>

summary

The aim of this work was to determine the mechanism associated to the linamarase/linamarin/glucose oxidase (*lis/lin/GO*) system, a therapeutic strategy based on the combination of cyanide and oxidative stress, which demonstrated its ability to block tumor growth. After mitochondrial insult, and hydrogen peroxide production there is a degradative phase of these damaged organelles, inducing mitophagy and subsequently autophagy mediated cell death. Here we demonstrate that autophagy may block caspases activation therefore inhibiting apoptosis at the mitochondrial level. Additionally, the *lis/lin/GO* system generated two different profiles of death, one characterized by mitochondrial damage and plasmatic membrane maintenance, and the other one without mitochondrial damage and plasmatic membrane disruption. These death profiles show a different regulation of Hsp70, what might represent a new function of this chaperone, which may regulate or participate directly in the necrotic type of death. Autophagy is mainly a cellular recycling process that promotes survival, but it can also cause cell death if cell injury persists. The role of autophagy in tumorigenesis and cell death remains ambiguous. Other cell death types, such as apoptosis or necrosis, are often impaired during tumor development and therefore are not ideal targets to generate efficient antitumor therapies. In this work, we have observed that *c-myc* or *ras* overexpression that lead to tumor development stimulates AMPK activation, a positive regulator of autophagy, as well as the up-regulation of BNIP3 and LC3 genes mediated by FoxO3. The increase of these autophagy-associated genes predisposes tumor cells to autophagic cell death as a consequence of mitochondrial stress. These results suggest that autophagy mediated death can be considered an efficient antitumor strategy.

introducción

Muerte celular programada

Durante el desarrollo de un organismo eucariótico multicelular, algunas células están destinadas a morir en un proceso que se denomina muerte celular programada. Esto refleja que en los organismos multicelulares el número total de células es una característica que está controlada de forma activa. De hecho, en el desarrollo de *C. elegans* mueren 131 de las 1090 células somáticas que contiene cada individuo durante el desarrollo. Un exhaustivo trabajo de muchas líneas de investigación ha demostrado que la mitocondria juega un papel central en la ejecución de la muerte celular. Se ha establecido recientemente que la participación de la mitocondria supone un punto de no retorno hacia la muerte. El hallazgo de los genes implicados en la muerte celular apoptótica de *C. elegans* denominados CED-3 y CED-4 (Ellis y Horvitz 1986), que les permitió a Brenner, Horvitz y Sulston obtener el Premio Nóbel en 2002, fue el inicio de uno de los campos de investigación más importantes de los últimos años. La primera apreciación sobre este tema fue realizada por Kerr en 1972, quien demostró que existían al menos dos tipos diferentes de morfología de muerte en las células, que se han denominado apoptosis y necrosis (Kerr et al. 1972). El entendimiento de los tipos de muerte celular ha permitido clarificar numerosos procesos patológicos ya que en casi todos ellos está implicado algún mecanismo de muerte que se ve afectado de diversas formas. La muerte celular es parte de todos los procesos biológicos desde el desarrollo de los organismos, y se ve afectada en casi todas las patologías hasta el final del proceso vital, donde se revela un mecanismo de muerte que acompaña al envejecimiento como lo es la senescencia.

Necrosis

Desde hace bastante tiempo los patólogos se dieron cuenta de que el balance entre renovación y muerte en un tejido estaba sesgado en algunos procesos patológicos. Esta forma de daño tisular se denominó necrosis, del griego “nekros”, muerte. Existen pocos ejemplos de mecanismos de ejecución de muerte en los que se haya demostrado una implicación de este proceso celular, sin embargo, su papel en el desarrollo, la homeostasis y las enfermedades es de gran relevancia.

Este tipo de muerte también se denomina oncosis (Van Cruchten y Van Den Broeck 2002), ya que, al contrario que la apoptosis, a veces ocurre a través de un proceso traumático de destrucción que implica la ruptura de la membrana plasmática, la degradación de orgánulos y el hinchamiento celular.

Se asume que la muerte necrótica es el resultado de un desbalance bioenergético

u homeostático irreversible. Aunque esta definición es muy amplia, una característica es el hecho de que la decisión de muerte puede no ser intrínseca de la célula, a pesar de que ocurre dentro de ella. Esta hipótesis se basa en datos experimentales que confirmaron que las características morfológicas de esta muerte pueden estar causadas por condiciones suprafisiológicas, como podría ser el someter a las células a una fuerza mecánica, calentamiento o enfriamiento (Zong y Thompson 2006).

A pesar de estas especulaciones de que la necrosis se produce de forma no regulada, en el contexto de un órgano, no como en células individuales, la necrosis puede estar modulada y estimular la ejecución de procesos inflamatorios que, en la mayoría de los casos, inician una respuesta de reparación del tejido circundante, dando origen a la angiogénesis, que es fundamental para la homeostasis general del individuo. Así, este aspecto es de gran interés en la tumorigénesis debido a que este tipo de muerte se encuentra habitualmente en el seno de los tumores. En especial, la necrosis suele favorecer el crecimiento y agresividad de los procesos patológicos que acompañan la carcinogénesis, como la angiogénesis (Degenhardt et al. 2006). En muchos casos se realiza una evaluación de este tipo de muerte durante el análisis patológico de diversos tipos de tumores, ya que define su estadio de agresividad (Ohgaki et al. 2004; Ohgaki y Kleihues 2007). Datos recientes indican que, a diferencia de la necrosis causada por condiciones extremas, hay varios ejemplos en donde esta forma de muerte puede ser un proceso fisiológico normal y regulado (Proskuryakov et al. 2003). Entre estos ejemplos encontramos:

- 1) Uno de los más ampliamente reconocidos es en el que la necrosis es causada por un fallo energético que es el que media la activación aguda de PARP. La proteína PARP es una polimerasa de poli-ADP-ribosa nuclear que es activada por cortes en el DNA, provocando la unión de oligómeros ADP-ribosa a diversos sustratos. Una excesiva activación de esta proteína, por ejemplo, por un intenso daño al DNA, se cree que causa la muerte celular porque, puede provocar un gran descenso de los niveles de ATP como consecuencia de su uso para la regeneración NAD^+ , que es el sustrato de PARP. Ésto, por ejemplo, podría causar una muerte selectiva de las células tumorales con alta tasa proliferativa debido a que necesitan el NAD^+ para generar ATP mediante el metabolismo de glucosa (Zong et al. 2004). También se ha observado que la inhibición de PARP suprime la necrosis (Kaufman 1999) o cambia el fenotipo de muerte a apoptosis. Durante la apoptosis, PARP-1 suele ser inactivada mediante su degradación específica por caspasas, formando un fragmento de 89 KDa inactivo. Por el contrario, utilizando un mutante de PARP-1 resistente a la degradación por caspasas se impide su inactivación, y las células se vuelven más sensibles a la inducción de necrosis por UV o TNF, aunque también exhiben un incremento en la apoptosis.

2) Aunque la necrosis fue siempre considerada un tipo de muerte opuesta a la apoptosis, se ha demostrado que varios de los mecanismos implicados en la apoptosis también están implicados en la necrosis. Uno de ellos es la protección ejercida por Bcl-2 y Bcl-XL, que inhiben la pérdida de potencial de membrana mitocondrial así como retrasan la muerte provocada por inhibidores de la cadena de transporte de electrones como el cianuro de hidrógeno, la rotenona o la actinomicina D (Shimizu et al. 1996b; Shimizu et al. 1996a). Adicionalmente, en otros estudios se demostró que la transfección del receptor de Fas en células de fibrosarcoma murino L929 activa las caspasas-3 y 7, pero la adición de péptidos inhibidores específicos de estas caspasas no boquean la muerte y el análisis por microscopía mostró que ésta muerte presentaba características de necrosis (Vercammen et al. 1998).

3) El estrés oxidativo en forma de peróxido de hidrógeno puede causar ambos tipos de muerte, apoptosis y necrosis, algo que puede ser prevenido por antioxidantes como el glutatión o la N-acetil-cisteína (Li et al. 2003). Además, la combinación de fármacos antitumorales con inductores de estrés oxidativo en dosis sub-tóxicas puede cambiar el modo de muerte de apoptosis a necrosis (Lee y Shacter 1999; Lee y Shacter 2000). Este efecto está probablemente asociado a un papel de señalización que desempeña el H_2O_2 , más que a una inhibición de caspasas o a la activación de PARP, ya que para esto son necesarias concentraciones más altas de H_2O_2 . Así, una reducción del contenido celular de glutatión también puede cambiar el modo en el que el estrés oxidativo induce muerte. Por lo tanto, el estrés oxidativo puede inducir una respuesta apoptótica cuando la célula mantiene su capacidad reductora frente al daño generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*), mientras que la necrosis se activa cuando la homeostasis del potencial red-ox está gravemente afectada.

4) La implicación de las mitocondrias en la muerte celular se conoce desde hace tiempo, pero su participación en la generación de las señales que determinan los distintos tipos de muerte es de gran interés actual. Más allá de la especial participación de la mitocondria en coordinar y ejecutar la activación de caspasas, la mitocondria es una de las fuentes principales de ATP, lo que le permite ser la responsable de la decisión de los programas de muerte dependientes o independientes de ATP. Adicionalmente, la mitocondria está implicada en la generación de estrés oxidativo y por lo tanto puede controlar un tipo adicional de señalización de muerte. El mantenimiento de ciertos niveles de ATP es un requisito necesario para la ejecución del programa de apoptosis (Ellis y Horvitz 1986; Jiang y Wang 2000) ya que es necesario para la formación del apoptosoma y para el transporte activo al núcleo de la DNasa activada por caspasas (CAD). Por ello, generalmente el descenso del ATP a niveles críticos puede provocar

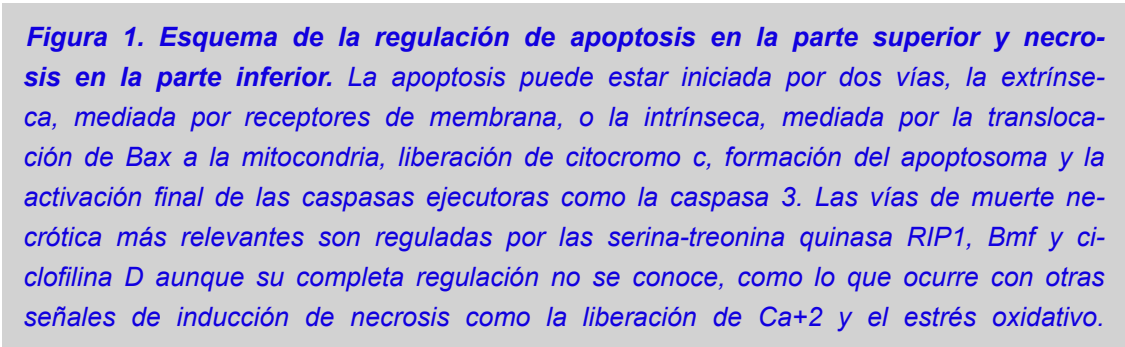
un cambio en el tipo de muerte. Así mismo, los inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial pueden inducir necrosis, por ejemplo, los compuestos que bloquean el complejo I como la rotenona, 1-metil-4-fenilpiridio o 6-hidroxitriptamina, que causan necrosis en el neuroblastoma PC12 (Hartley et al. 1994), o los que bloquean el complejo II como el ácido 3-nitropropionico, o el complejo III como la antimicina A (Shchepina et al. 2002) o también compuestos que bloquean el complejo IV como el cianuro (Shimizu et al. 1996b). También se ha demostrado que algunos inhibidores mitocondriales pueden no afectar la viabilidad de algunos tipos celulares debido, fundamentalmente, a que en éstos el mantenimiento de los niveles de ATP depende de la glucólisis. La razón por la que las células presentan diferente sensibilidad a la depleción de ATP no está clara, pero podría estar asociada a un severo desequilibrio en iones, como el Ca^{+2} , en las células sensibles (Yoshioka et al. 2000). Por otro lado, la mitocondria en algunas condiciones de estrés, como liberación de Ca^{+2} del retículo endoplasmático o estrés oxidativo, puede sufrir cambios drásticos como pérdida de su potencial de membrana, su hinchamiento o incluso su permeabilización, un proceso llamado MOMP (del inglés, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) (Lemasters et al. 1998), lo que constituye un proceso irreversible que lleva a la célula a entrar en apoptosis. Sin embargo, se ha sugerido que el MOMP también puede actuar como un inductor de necrosis a través de la liberación de factores mitocondriales como Ca^{+2} , proteasas o lipasas (Bernardi et al. 2001).

5) Otro tipo de reguladores de muerte necrótica son las proteasas, que tienen una participación en la mayoría de los mecanismos de ejecución de muerte celular. Existen ejemplos en los que la regulación de éstas sensibiliza a la muerte, como es el caso de las serpinas, que en su función normal están implicadas en la protección frente al daño lisosomal, inhibiendo la posible inducción de muerte necrótica, aunque su regulación en los mecanismos de muerte en mamíferos, no ha sido aún estudiada (Luke et al. 2007).

6) Recientemente se ha descubierto una vía de señalización en la muerte necrótica, denominada necroptosis, que postula una ruta de muerte en la que RIP1 coordina el inicio y la ejecución. Así, otros reguladores, como Bmf, parecen cooperar en esta vía aunque el modo de ejecución es parecido a otros, ya que PARP parece ser el efector común (Hitomi et al. 2008). En esta muerte, que se inicia mediante los receptores de tipo TNF en presencia de inhibidores de caspasas, RIP1 parece ser la molécula que puede decidir entre la activación de apoptosis o necrosis.

Es importante resaltar que, como casi todos los mecanismos controlados de muerte, la necrosis cumple un papel importante en los procesos biológicos. Un ejemplo

Durante un largo periodo de tiempo se estableció que la necrosis era un proceso pasivo en el que la célula se moría de una forma descontrolada. Sin embargo, los datos resumidos anteriormente, nos hacen especular que la necrosis puede ser un proceso regulado por un conjunto de transducción de señales y un mecanismo catabólico.



La apoptosis es un proceso de muerte celular que se caracteriza por el redondeo de la célula, la retracción de pseudopodos, la reducción del volumen celular y de su núcleo (*piknosis*), la condensación de la cromatina, y la fragmentación nuclear

(kariorrhexis). Durante el proceso las organelas son modificadas levemente o no lo son en absoluto a nivel ultraestructural, y ocurre un ondulamiento y vacuolización de la membrana plasmática aunque la membrana plasmática se mantiene intacta durante el desarrollo de la muerte (Galluzzi et al. 2009). Y así, estas células apoptóticas son normalmente engullidas por los fagocitos residentes. Pero si el proceso de fagocitosis no se efectúa, estas células pueden sufrir la ruptura de la membrana plasmática, lo que se conoce como apoptosis secundaria o necrosis *in vitro* (Kroemer et al. 2005; Kroemer et al. 2009). La apoptosis puede separarse en dos vías distintas dependiendo de si el estímulo de muerte está mediado por receptores de membrana, vía extrínseca, o directamente desde la mitocondria, vía intrínseca (Kroemer y Martin 2005). En las células de los vertebrados la vía mitocondrial de apoptosis está centrada y es determinada por el proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) que da paso a la muerte celular. Esto provoca que las proteínas secuestradas en el espacio intermembrana (Li et al.), entre la membrana mitocondrial interna (Datta et al.) y externa (Luke et al.), sean liberadas al citosol accediendo allí a otras proteínas como APAF y caspasa 9, que permiten la formación del apoptosoma y, por tanto, la activación de las caspasas efectoras.

Este punto de la ejecución de muerte divide a las moléculas implicadas en el proceso en dos tipos, las moléculas involucradas antes de la formación del MOMP, como las proteínas de la familia de Bcl-2 que se subdividen en anti-apoptóticas (que previenen el MOMP) y pro-apoptóticas (que favorecen el MOMP), y las proteínas que son afectadas tras la formación del MOMP. Estas últimas están incluidas dentro de varias familias e implican proteínas tales como citocromo c, HtrA2/Omi, SMAC/DIABLO y AIF/endonucleasa G.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se caracterizan por contener cuatro regiones de homología Bcl-2 (BH1-BH4). Dentro de los miembros anti-apoptóticos de ésta familia se encuentran las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1, A1 y Bcl-W que muestran un alto grado de conservación en todas las regiones BH. En concreto, Bcl-2 impide la deformación y vacuolización de la membrana plasmática, la contracción del volumen celular, la condensación nuclear y la degradación endonucleosómica del ADN, todas ellas propiedades apoptóticas. Esta proteína se localiza en la mitocondria revelando el papel central de ésta orgánulo en este mecanismo de muerte (Hockenbery et al. 1990). Por otro lado, se encuentran las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, como son Bax y Bak, que contienen multidominios BH1, 2 y 3 y parecen ser un prerrequisito para la formación del MOMP, ya que, probablemente, son las mediadoras directas de la apertura de un poro intermedio sobre la membrana mitocondrial externa. Bax fue la primera proteína homóloga identificada por interaccionar con Bcl-2 (Oltvai et al. 1993).

Se observó que los ratones deficientes en Bax desarrollan una expansión excesiva de las poblaciones celulares o hiperplasias. En cuanto a su función, Bax reside inactiva en el citosol o está débilmente unida a la mitocondria y, cuando se produce un estímulo de muerte, se inserta en la membrana mitocondrial externa formando homo-oligómeros. Por el contrario, Bak reside en la mitocondria y ante un estímulo de muerte sufre un cambio conformacional que lleva a la formación de un poro de transición de permeabilidad (Wei et al. 2001). En la célula, la proporción de moléculas anti-apoptóticas respecto a pro-apoptóticas, como Bcl-2/Bax, constituye un reóstato que establece el umbral de susceptibilidad a inducir apoptosis por la ruta intrínseca de muerte, que utiliza la red mitocondrial para amplificar la señal de dicha muerte.

Por otro lado se encuentran las proteínas BH3-only, que sólo contienen regiones de tipo BH3. Estas proteínas son pro-apoptóticas y sirven como centinelas ya que responden a diversos estímulos (Bouillet y Strasser 2002) como, por ejemplo, la ruta extrínseca activada a través de receptores de membrana del tipo TNF. En este caso, se activan las caspasas 8/10 que a su vez procesan a Bid dando lugar a tBid (del inglés *truncated Bid*, un producto de 22 kDa), que conecta la vía extrínseca con la intrínseca de muerte. Ensayos realizados con mitocondrias reconstituidas revelan que tBid sirve como ligando de unión a la membrana mediante su región BH3, que facilita la oligomerización de Bax/Bak (Wei et al. 2001). Por el contrario, la actividad pro-apoptótica de otras moléculas BH3-only es regulada a nivel transcripcional, como es el caso de NOXA, PUMA, que se activan por p53 ante una señal de daño al DNA (Villunger et al. 2003) y, otras como BNIP3 y BIM que se estimulan en respuesta a otros factores de transcripción como FOXO y HIF (Mellor y Harris 2007; Fu y Tindall 2008). Estas proteínas también pueden regularse a nivel postraducciona, como por la fosforilación de Bad o BIM en respuesta a factores de supervivencia o de crecimiento (Zha et al. 1996).

Una de las características generales de las proteínas con una región BH3 es inhibir las proteínas anti-apoptóticas (Galonek y Hardwick 2006; Kim et al. 2006a) en un modelo de orden jerárquico, en el cual las pro-apoptóticas inhiben las anti-apoptóticas y, a su vez, éstas inhiben a un conjunto de pro-apoptóticas impidiendo la oligomerización de Bax/Bak, que en definitiva ejecuta el daño mitocondrial.

El paso siguiente a la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en la apoptosis es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), que está estrechamente unido a la activación de caspasas. El mecanismo responsable de la formación del MOMP aún no ha sido completamente esclarecido, aunque se han caracterizado algunas de las proteínas implicadas en este proceso.

La regulación local y ejecución del MOMP involucra proteínas de la familia de Bcl-2, lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el flujo de metabolitos bioenergéticos y componentes que se cree que están implicados en la formación del poro de transición de permeabilidad (PTP) (Green y Kroemer 2004). Aunque no se conoce la estructura del PTP con exactitud, parece estar formado por varios componentes: la proteína ANT (translocador de nucleótidos de adenina), VDAC (canal de aniones dependiente de voltaje), la ciclofilina D y el receptor para benzodiazepinas (Belzacq et al. 2002; Kim et al. 2003). La apertura de este poro por diversos estímulos, como la pérdida de la homeostasis de Ca^{+2} , parece inducir el hinchamiento mitocondrial y la ruptura de la MME (membrana mitocondrial externa) permitiendo la liberación no-específica de proteínas del EIM (espacio intermembrana mitocondrial). Muchas de estas proteínas, como citocromo c, HtrA2/Omi, SMAC/DIABLO y AIF/endonucleasa G, son iniciadoras de la muerte celular (Kim et al. 1991; Zamzami et al. 1996; Cregan et al. 2004; Le Bras et al. 2005). También ha sido propuesta una variación de este modelo en el que se postula la existencia de una interacción entre Bax, ANT (Marzo et al. 1998), y VDAC (Shimizu et al. 1999). En relación a esta teoría, recientemente se ha demostrado mediante la generación de formas inactivas de ANT que se puede inducir la transición de permeabilidad en mitocondrias en las que falta ANT, aunque, en este caso, la cantidad de Ca^{+2} necesaria como estímulo de muerte debe ser tres veces mayor y, además, la formación de PTP pierde la regulación mediada por los ligandos de ANT (Kokoszka et al. 2004). Una posibilidad para explicar este modelo es que VDAC secuestre pequeñas cantidades de cardiolipina, o lípidos relacionados, en microdominios y así permitiría que su concentración sea suficiente para que Bax activado induzca directamente la permeabilización de la membrana (Green y Kroemer 2004). Un control adicional sobre la permeabilización de la MME lo ejercen la proteasa PARL y la proteína OPA1 que controlan la remodelación de las crestas mitocondriales (Cipolat et al. 2006; Frezza et al. 2006)

Una vez que ocurre el MOMP, las proteínas del EIM alcanzan el citosol. Una de las más relevantes es el citocromo c que se une a APAF-1 (factor-1 activador de proteasa apoptótica) y, mediante esta interacción, permite un cambio en la conformación de APAF-1 mediado por ATP que promueve su oligomerización para formar el apoptosoma. A continuación, se oligomeriza la procaspasa 9 uniéndose a este complejo y constituyendo el apoptosoma activado, lo que permite el procesamiento proteolítico de caspasa 9 que conduce a la iniciación de una cascada proteolítica que implica la activación de caspasa 3 y 7. El procesamiento proteolítico de caspasa 3 puede activar caspasa 2 y caspasa 6, y esta última a caspasa 8 y 10 (Slee et al. 1999) (Figura apoptosis). Por último, dentro de la gran cantidad de sustratos que degrada la caspasa 3 (Fischer et

al. 2003) se encuentra el ICAD (inhibidor de la DNAsa activada por caspasas), cuya degradación permite la activación de la CAD (DNAsa activada por caspasas), que es la responsable de la degradación intranucleosomal del ADN celular. Esto conlleva a la degradación del ADN, lo cual culmina en la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos (Enari et al. 1998; Lechardeur et al. 2000)

Por otro lado, también se ha descrito una vía de activación de apoptosis independiente de la mitocondria en la que determinados estímulos de muerte pueden estar coordinados por el retículo endoplasmático (RE). Este tipo de apoptosis se desencadena, por ejemplo, cuando las células son expuestas a agentes como tunicamicina (un inhibidor de la N-glicosilación del RE), brefeldina A (un inhibidor de la Ca^{+2} -ATPasa) o por la acumulación de proteínas con un plegamiento incorrectamente (Kaufman 1999). La caspasa 12 está específicamente localizada en la cara citoplasmática (membrana externa) del RE y, al parecer, cumple un papel importante en la muerte celular mediada por estrés del RE (Nakagawa et al. 2000). En condiciones de estrés reticular la caspasa 12 se translocada del retículo endoplasmático al citosol, donde directamente procesa a la procaspasa 9 que finalmente activa la caspasa 3 efectora, proceso que parece estar controlado por Bax/Bak (Morishima et al. 2002; Ruiz-Vela et al. 2005). Sin embargo, existe una activación de caspasa 9 independiente del apoptosoma y de la mitocondria que esta mediada por la caspasa 12. Esto fue demostrado en experimentos en MEFs (fibroblastos embrionicos de ratón) *Apaf1^{-/-}*, en los que la inducción de apoptosis mediada por RE permanece inalterada (Rao et al. 2002). Aunque el gen de la caspasa 12 humana contiene mutaciones que cambian la secuencia de lectura y crean un codón de parada de la transcripción (Fischer et al. 2002) haciendo que esta caspasa no sea funcional en los humanos, se ha demostrado que la caspasa 4 podría suplir en algunos procesos la función de la caspasa 12 murina (Kim et al. 2006b).

Una de las observaciones más llamativas que ocurre en los ratones deficientes de los genes pro-apoptóticos *bax* y *bak*, en los que la apoptosis mitocondrial estaría bloqueada, es que nacen y crecen de forma relativamente normal (Lindsten et al. 2000). Esta observación nos permite hipotetizar que aunque la apoptosis dependiente del poro de Bax/Bak ejerce un control primordial en la mayoría de los tipos de estímulos de muerte apoptótica, estas proteínas tienen una participación parcial o temprana en la ejecución de la apoptosis. Esto quedaría parcialmente explicado en los experimentos realizados en el ratón doble KO (del inglés *knockout*) de las caspasas 3/7 en donde realmente se puede evidenciar el papel de la apoptosis dependiente de caspasas (Lakhani et al. 2006). Estos ratones mueren en un estadio temprano del desarrollo del embrión, E20, por una deficiencia cardíaca. En este caso, los fibroblastos embrionarios de estos

ratones presentan una pequeña pérdida de potencial de membrana mitocondrial tras la inducción de daño al DNA en comparación con los heterocigotos de caspasas 3^{+/-} y 7^{+/-}. La interpretación de estas observaciones es que la activación de caspasas favorece la pérdida de potencial de membrana mitocondrial de forma independiente de Bax/Bak, permitiendo la ejecución completa de la muerte apoptótica.

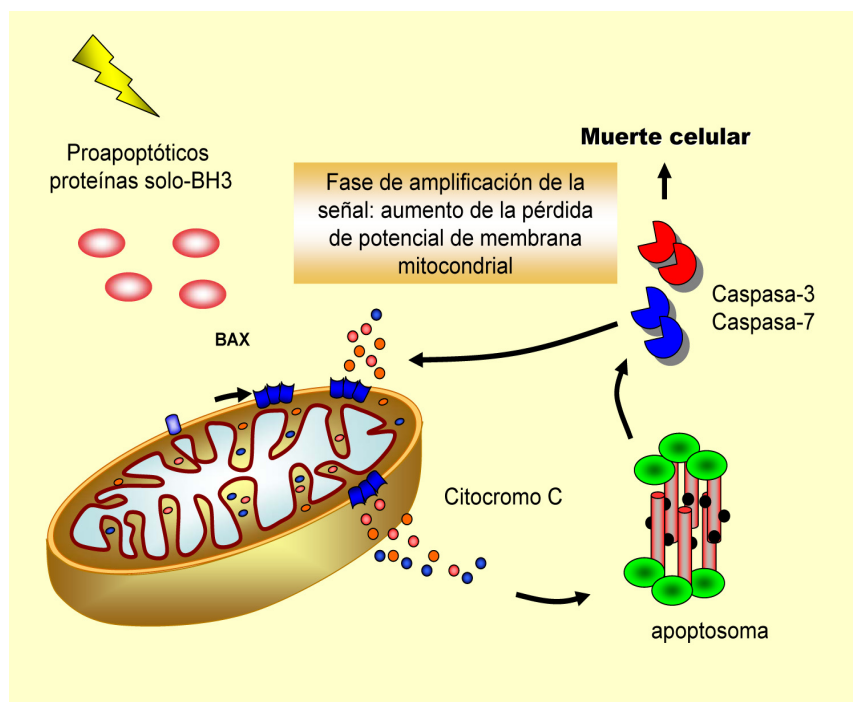


Figura 2. Esquema mostrando la inducción de muerte por daño al DNA. Donde se requiere la activación de caspasas para transmitir una segunda señal de amplificación de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, y así, se completa la ejecución de la muerte apoptótica dependiente de caspasas.

Muerte independiente de caspasas

La muerte independiente de caspasas (CICD, del inglés *caspase-independent cell death*) se define como una situación en la que la célula pierde la viabilidad en condiciones pro-apoptóticas que ocurren en inhibición o ausencia de función de las caspasas (Chipuk y Green 2005). Esta muerte muestra la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, pero este efecto no puede ser revertido mediante la inhibición de caspasas. A este respecto se ha demostrado que la mitocondria contiene efectores de muerte independientes de caspasas, como AIF (del inglés, *apoptosis inducing factor*) y Endo G (endonucleasa G). Durante la apoptosis tanto Endo G como AIF se translocan de la mitocondria al núcleo causando la condensación periférica de la cromatina y la fragmentación del DNA a gran escala y a nivel oligonucleosomal (Susin et al. 1999b;

Andrews et al. 2001). Estudios posteriores han demostrado que Endo G cataliza tanto el corte del DNA de alto peso molecular como la degradación oligonucleosomal de una manera secuencial, para lo cual coopera con exonucleasas y la DNAsa I, que le facilitan el procesamiento (Widlak et al. 2001). Sin embargo, el mecanismo en el que Endo G y AIF cooperan en la ejecución de la muerte ha sido sólo demostrado en el modelo de *C. elegans* (Wang et al. 2002), pero no en mamíferos. No obstante, se ha sabe que ambas proteínas tienen la capacidad de generar daño al DNA por separado (Susin et al. 1999b; Li et al. 2001; Parrish et al. 2001)

Existen varios mecanismos por los que AIF puede inducir muerte celular y uno de los primordiales involucra a PARP-1 (polimerasa de poli[ADP-Ribosa] tipo I). Distintos estímulos como desequilibrio del Ca^{+2} y estrés oxidativo pueden inducir daño al DNA, lo que activaría PARP-1, que une ADP-ribosa a gran cantidad de proteínas y en este proceso consume NAD^{+} , bajando los niveles de ATP, ya que éste es necesario para la regeneración del NAD^{+} (Smulson et al. 2000). Esta situación no ocurre en la apoptosis dependiente de caspasas ya que PARP-1 es un sustrato de la caspasa 3, que lo inactiva y de esta forma mantiene los niveles de energía. Así mismo, se ha demostrado que al exponer las células a agentes alquilantes o peróxido de hidrógeno, éstas mueren por activación de PARP-1 sin participación de las caspasas y con translocación de AIF al núcleo, con características morfológicas de apoptosis (Yu et al. 2002). El mecanismo por el cual PARP-1 favorece la liberación de AIF podría implicar la translocación de PARP-1 del núcleo a la mitocondria induciendo la liberación de AIF, como se demuestra por el hecho de que la inhibición de PARP-1 impide este proceso (Yang et al. 2003).

Otro mecanismo de activación de AIF está mediado por Bax. Mientras que hay un consenso generalizado sobre las funciones de AIF en respuesta a la activación de proteínas de la familia de Bcl-2, existe cierta controversia sobre su independencia respecto a la activación de caspasas. Uno de los modelos sugiere que la función de AIF es anterior e independiente de caspasas (Yu et al. 1986; Susin et al. 1999a; Susin et al. 1999b; Daugas et al. 2000). Alternativamente, en un segundo modelo se ha propuesto que AIF puede funcionar independiente de la activación de caspasas, actuando como una respuesta secundaria para asegurar que la apoptosis se complete (Cregan et al. 2004). Finalmente, un tercer modelo sugiere que la liberación de AIF del EIM depende estrictamente de la activación de caspasas y, además, que en presencia de determinados estímulos, como, por ejemplo, la estaurosporina, las células mueren por apoptosis independiente de la activación de caspasas e independiente de AIF aunque este sea liberado de la mitocondria (Arnoult et al. 2002; Arnoult et al. 2003).

Recientemente se ha demostrado otro posible mecanismo de apoptosis

independiente de caspasas que involucra a HtrA2/Omi, que a pesar de actuar como un regulador de la apoptosis dependiente de caspasas por inactivación de IAP, puede degradar a HAX-1 mediante su actividad proteasa de serina, lo que induciría apoptosis por un mecanismo que aún no ha sido clarificado (Suzuki et al. 2001; Cilenti et al. 2004).

La ejecución de la muerte en ausencia de activación de caspasas, aunque es un modelo de muerte, está poco aceptado actualmente debido a la variedad de mecanismo implicados y su escasa participación en modelos animales, como denota su exclusión de la clasificación de muerte celular (Kroemer et al. 2005; Kroemer et al. 2009).

CÁNCER

En el siglo XXI el cáncer sigue siendo una de las enfermedades que más muertes causan al año. La mayoría de las terapias tradicionales, como quimioterapia y radioterapia, fracasan debido a que las células tumorales acumulan mutaciones que les confieren resistencia a dichos tratamientos, en especial a las que promueven muerte por apoptosis dependiente de caspasas, como mutaciones en los genes que corresponden a las caspasas, p53, etc (Zhivotovsky y Kroemer 2004; Lopez-Otin y Matrisian 2007). Por ello es necesario desarrollar nuevas terapias que sean capaces de superar la resistencia adquirida por las células tumorales, por ejemplo sistemas que generen un tipo de muerte independiente de caspasas.

La muerte celular programada ha sido estudiada exhaustivamente en las dos últimas décadas. Ésto ha llevado a comprender la gran relevancia que cumple este proceso biológico en la mayoría de las enfermedades y la homeostasis general. Estos estudios han permitido notables avances en el diagnóstico y en el enfoque terapéutico del cáncer y de otras patologías (Dai y Grant 2007; Lessene et al. 2008; Vazquez et al. 2008).

Los avances tecnológicos han mejorado el diagnóstico y el tratamiento de los tumores primarios. A pesar de estos avances, la morbilidad y mortalidad siguen siendo elevadas, como, por ejemplo, la supervivencia media en pacientes con glioblastomas multiformes es de 9 a 12 meses (Stupp et al. 2005). El principal quimioterapéutico utilizado para los glioblastomas es la temozolamida que, aunque representa una opción terapéutica en combinación con radioterapia, sólo es aplicable en determinados tipos de tumores. Ésto se debe a que la eficiencia de este quimioterapéutico está afectada por la metilación del promotor de la proteína MGMT, presente en algunos tumores, haciendo que el tratamiento de radioterapia en combinación con la temozolamida

alcance un escaso efecto beneficioso (Esteller et al. 2000; Hegi et al. 2005).

Lo sorprendente es que, a pesar de los avances en el entendimiento de la biología del cáncer, muchas estrategias terapéuticas siguen basándose en el mismo principio, la utilización de sustancias que ejercen un daño al DNA, como la temozolomida, que sólo han conseguido provocar un retraso en la muerte de los pacientes con glioblastoma multiforme de aproximadamente 6 meses (Hegi et al. 2005; Stupp et al. 2005).

Además, recientemente se ha descubierto que una pequeña proporción de células del tumor tienen características de células troncales (Dirks 2006; Morrison y Kimble 2006; Zheng et al. 2008). Esto genera una desventaja para la aplicación de terapias que producen daño al DNA, debido a que, una de las principales propiedades de estas células con características troncales, es que presentan una baja tasa proliferativa y, además, una resistencia intrínseca a morir por daño al DNA debido a la sobre-activación de los mecanismos de reparación del DNA. Por ello se cree que estas células son las responsables tanto del origen del tumor como de las recidivas (Bao et al. 2006; Diehn y Clarke 2006; Phillips et al. 2006; Diehn et al. 2009).

La mayoría de las estrategias terapéuticas que se aplican contra las células tumorales no hacen distinción alguna entre las células troncales cancerosas y el resto de las células tumorales. Tradicionalmente los tratamientos contra el cáncer se basan en la eliminación de las células con alta tasa proliferativa (Hambardzumyan et al. 2008a; Hambardzumyan et al. 2008b), pero curiosamente las células troncales cancerosas se dividen con baja frecuencia, por lo que estas terapias fracasan en su eliminación. Este nuevo concepto de cáncer también puede cambiar nuestra percepción de resistencia a fármacos. Tanto las células troncales normales como las tumorales poseen una serie de proteínas transportadoras complejas, que incluyen las pertenecientes al sistema ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*) y que expulsan agentes quimioterapéuticos con gran celeridad a expensas de ATP (Lou y Dean 2007). Esta función podría explicar la resistencia a fármacos muy frecuentemente observada en las células tumorales.

Teniendo en cuenta estas observaciones, podríamos predecir que para conseguir la erradicación total de un tumor e impedir las recidivas, que con tanta frecuencia aparecen, por ejemplo, en los tumores cerebrales, necesitaríamos un sistema que eliminara no sólo las células en división sino también las quiescentes del tumor, es decir, células con características troncales. Además, debería ser un sistema que no pudiera ser expulsado por las proteínas transportadoras del tipo ABC o que las inactivara (Bleau et al. 2009). Finalmente, la terapia no debería focalizarse en la producción del daño al ADN, debido a que las células troncales tumorales son resistentes a dichas terapias. Así pues, buscamos un sistema terapéutico que provoque la muerte celular

por una vía independiente de caspasas, que suele estar bloqueada en el proceso tumorigénico, como podría ser un aumento del estrés oxidativo intolerable para la célula o un desbalance metabólico/energético (Jin et al. 2007; White 2007).

Sistema *lis/lin/GO*

Por esta razón se estudiaron los mecanismos de inducción de muerte celular, involucrados en el sistema *linamarasa/linamarina* combinado con glucosa oxidasa (*lis/lin/GO*), como inductores de hipoxia química y estrés oxidativo. Esta original combinación es muy efectiva como terapia antitumoral, fue estudiada inicialmente en modelos de tumores de perro y rata, en nuestro laboratorio, con excelentes resultados. El sistema *lis/lin/GO* está basado en un gen de origen vegetal *linamarasa* procedente de la cassava (*Manihot esculenta* Crantz) y su sustrato inocuo, linamarina, que cuando se combinan producen glucosa y acetona-cianohidrina, y esta última se transforma espontáneamente en cianuro y acetona (Cortes et al. 1998). Por lo tanto, *lis/lin* constituye un sistema biológico controlado de producción de cianuro. Así, al introducir el gen *lis* en células de mamífero la proteína linamarasa es transportada al espacio extracelular gracias a la presencia de un péptido señal en su secuencia y, allí, al encontrarse con su sustrato linamarina se produce cianuro en el espacio extracelular, el cual difunde libremente a través de las membranas celulares. El cianuro generado provoca el bloqueo de la cadena de transporte de electrones con la consecuente inhibición de la producción de ATP y generación de especies reactivas de oxígeno (Cortes et al. 2002).

Posteriormente, el sistema *lis/lin* se combinó con glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que transforma la glucosa en ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno, favoreciendo la muerte celular debido a que el H_2O_2 es una señal de muerte adicional a la generada por el cianuro (García-Escudero y Gargini 2008). Esta combinación produce un adelantamiento de la muerte en 48 h en diversos tipos celulares como gliomas, carcinomas de cérvix y de mama.

Implicación de la muerte celular en la carcinogénesis

La resistencia a la muerte celular es una característica común de la mayoría, si no de todos, los tumores. Una interpretación que se ha ido imponiendo en estos últimos 30 años (Monni et al. 1997; Rampino et al. 1997; Ionov et al. 2000) es que el desarrollo de una hiperplasia puede ser tanto el resultado de la disminución en la capacidad de morirse de las células, como una consecuencia del aumento de la proliferación. Así, por ejemplo, en determinados procesos de tumorigénesis pueden observarse alteraciones

que implican ganancia de función del factor anti-apoptótico Bcl-2, o la pérdida de función de Bax.

Así mismo, existen notables ejemplos de estos procesos que tienen lugar en el desarrollo de leucemias y linfomas. Un caso que reflejaría este hecho es que en el 85% de los linfomas foliculares ocurre una modificación denominada translocación $t(14;18)(q32;q21)$ en la cual *bcl2* se sobre-expresa como proteína de fusión Ig-Bcl2 (Bakhshi et al. 1985). Ésta contribución se pone de manifiesto en el modelo de ratón transgénico donde esta translocación causa una hiperplasia folicular de linfocitos B (McDonnell et al. 1989). El análisis detallado del ciclo celular indica sorprendentemente que no hay una diferencia substancial en la fracción de células que se encuentran activamente en el ciclo en las células aisladas del ratón transgénico y con respecto las del control. La mayoría (95%) de las células se encuentran en fase G0/G1. Adicionalmente, la sobre-expresión de *bcl-2* evita la muerte en líneas celulares que son cultivadas en ausencia de factores de crecimiento sin aumentar su proliferación (Nunez et al. 1990).

Por el contrario, hay otros tipos de alteraciones que ocurren en determinados procesos carcinogénicos, que sí afectan a la proliferación, como es el caso de *c-myc*. Este proto-oncogén se encuentra aumentado en varios procesos tumorales, como en el linfoma de Burkitt. Este tipo de modificaciones génicas suelen encontrarse cooperando con procesos de bloqueo de apoptosis. Un ejemplo es el modelo de ratón transgénico en el que se sobre-expresa $E\mu$ -myc. Este ratón desarrolla linfomas de células B clonales, con una latencia de 3-5 meses. Pero no desarrolla hiperplasia como en el caso del ratón *Ig-bcl2*, a pesar de tener una tasa de proliferación más elevada.

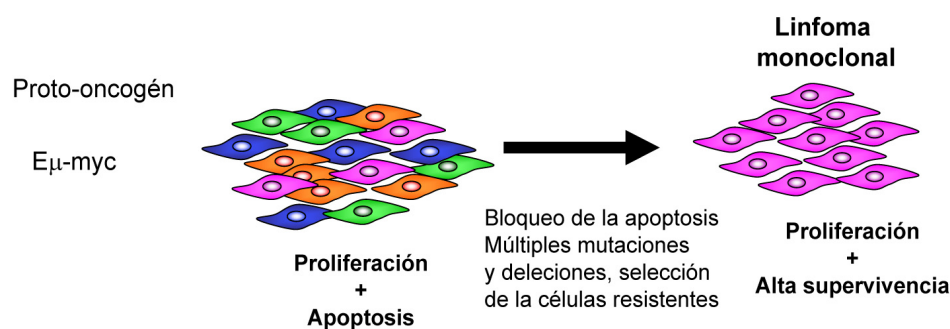


Figura 3. Implicación de la muerte apoptótica en el desarrollo de la carcinogénesis inducida por el proto-oncogén *myc* en un modelo de ratón.

Existen otros ejemplos en los que el bloqueo de apoptosis coopera directamente con los oncogenes para favorecer la generación de tumores. Uno de ellos ocurre en ciertos linfomas de Burkitt, donde es frecuente encontrar mutaciones en el gen *c-*

myc que se ha amplificado, estas mutaciones denominadas T58A y P57S, tienen la capacidad de bloquear la muerte dependiente de p53 y así producir una carcinogénesis más eficiente en la que el desarrollo de los tumores tiene un periodo de latencia más corto (Hemann et al. 2005).

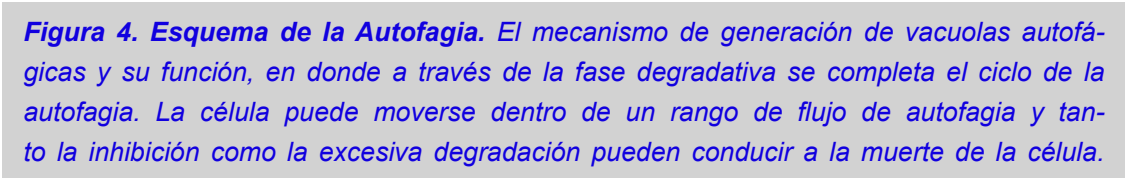
Autofagia

La autofagia es un mecanismo conservado y que cumple una función primordial en la homeostasis celular. El proceso de autofagia se caracteriza por la formación de vesículas citosólicas de doble membrana, que pueden engullir partes grandes del citoplasma de la célula. Estas vacuolas son conocidas como autofagosomas y posteriormente se fusionan con los lisosomas en una fase de degradación del contenido de las vacuolas, y se denominan autolisosomas (Levine y Klionsky 2004; Mizushima et al. 2008).

El sitio de ensamblaje del fagóforo (Figura 4) es un proceso complejo que requiere múltiples complejos, se denomina PAS (del inglés, *phagophore assembly site*) y es el sitio de iniciación de las membranas que darán lugar a la vacuola autofágica. El conjunto central de la maquinaria de generación de vacuolas esta formada por tres grupos funcionales principales: (1) Atg9 y las proteínas que regulan su ciclo, el complejo Atg1 quinasa, (Atg1 y Atg13), Atg2 y Atg18; (2) El complejo fosfatidilinositol 3-OH quinasa, Vps34, Vsp15 (del inglés, *vacuolar protein sorting*), Atg6 (Beclina 1) y Atg14 y (3) Dos sistemas de conjugación Ubl (del inglés, *ubiquitin-like protein*) como ubiquitina son parte del proceso de elongación de vesículas. Por un lado una vía involucra la conjugación covalente de Atg5 a Atg12, con la ayuda de Atg7 una enzima similar a E1 y Atg10 enzima similar a E2. Por otro lado, el segundo sistema implica la conjugación de fosfatidiletanolamina a LC3/Atg8 en un proceso que se denomina lipidación, este proceso es ejecutado por, dos enzimas análogas a las enzimas que conjugan ubiquitina (Atg10 y Atg3) y una proteasa (Atg4) que modifica Atg8, haciendo que se libere de la unión a la fosfatidiletanolamina (Levine y Klionsky 2004; Xie y Klionsky 2007).

Atg8/LC3 es la única proteína de estos múltiples complejos que queda retenida en la membrana de la vacuola y por esto su transformación de LC3I a LC3II es uno de los principales marcadores de incremento en la cantidad de vacuolas (Maiuri et al. 2007; Galluzzi et al. 2009).

Aunque la función principal de la autofagia es de protección celular debido a su capacidad de reciclar el contenido citoplasmático, si esta degradación persiste, puede provocar la degradación de componentes fundamentales como lo son las mitocondrias



Autofagia, un mecanismo de muerte celular muy eficiente

El proceso de autofagia se inicia en la mayoría de los casos por acumulación de componentes tóxicos para la célula y, si este proceso persiste, el deterioro general de la célula conduce a su muerte. Aunque los efectores moleculares de este tipo de muerte no se conocen aún en su totalidad, varios inductores parecen estimular una muerte drástica dependiente de vacuolas autofágicas (Mizushima et al. 2008). Así, agentes tóxicos como el trióxido de arsénico, rapamicina, inhibidores de PI3K o incluso otros no tan específicos pueden inducir autofagia (Kondo et al. 2005; Kondo y Kondo 2006).

Además, se ha demostrado recientemente que varios inhibidores de la cadena de transporte de electrones tienen una gran facilidad para inducir autofagia, debido a la capacidad de éstos de generar estrés oxidativo (Chen et al. 2007; Chen y Gibson 2008). Estos inhibidores generan además un segundo efecto, la fisión mitocondrial, que podría favorecer que las mitocondrias fragmentadas fueran más fácilmente engullidas por las vesículas autofágicas, lo que se conoce como mitofagia (Lemasters 2005; Kim et al. 2007; Tolkovsky 2009). Esto desencadena una pérdida eficiente del potencial de membrana mitocondrial o MOMP (Twig et al. 2008), haciendo que los inhibidores de la cadena de electrones sean capaces de inducir muerte por autofagia.

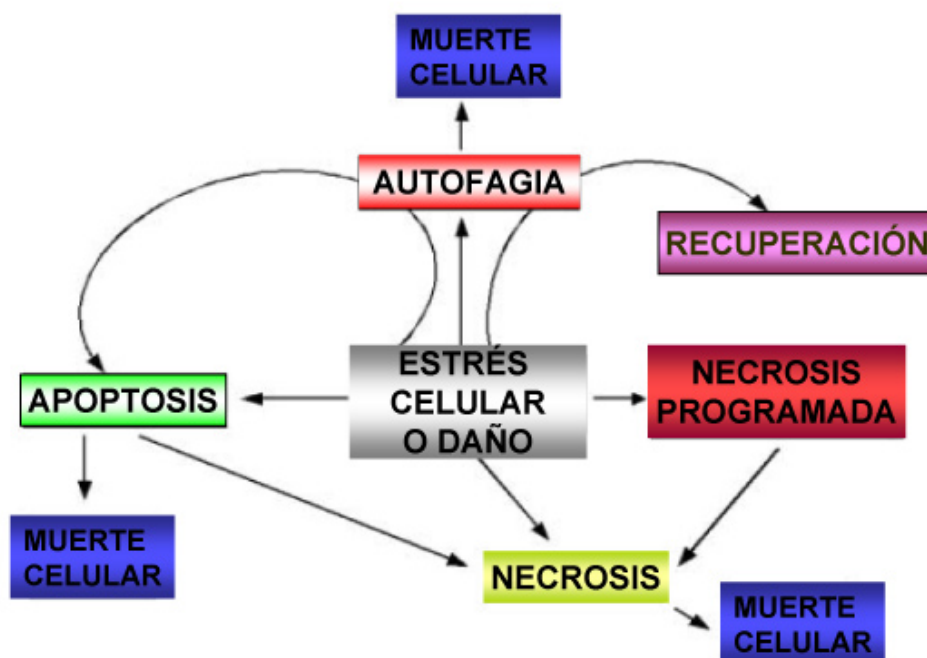


Figura 5. Relación entre los tipos de muerte celular. Distintos tipos de muerte celular y cómo la autofagia contribuye a estos procesos, tanto en recuperación como en la ejecución de la degradación aguda que desencadena la muerte autofágica.

Mitofagia: Reciclando la mitocondria, un juego entre la vida y la muerte

Las mitocondrias constituyen un orgánulo dinámico que está en continuo proceso de fusión y fragmentación. Uno de los pasos fundamentales en la apoptosis es la fragmentación mitocondrial, y se ha demostrado recientemente que la maquinaria de fisión mitocondrial participa activamente en los procesos de muerte celular (Youle y Karbowski 2005). Sin embargo, la fragmentación de la mitocondria es un proceso reversible que puede ser inducido sin generar apoptosis, por ejemplo, inhibiendo la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Lyamzaev et al. 2004) o ante una elevación de los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos. En este último caso, la fragmentación puede considerarse como un mecanismo de defensa de la célula que esta sometida a un estrés y lo utiliza para interrumpir la propagación de la señal de muerte mediada por la liberación de Ca^{2+} (Szabadkai et al. 2004).

Se ha demostrado que DRP1 y FIS1, dos proteínas que median la fisión mitocondrial, juegan un importante papel en la fragmentación de la red mitocondrial observada en la apoptosis (Frank et al. 2001; Karbowski et al. 2002; James et al. 2003; Lee et al. 2004). También se ha observado que la inhibición de estas proteínas impide la liberación de citocromo c del espacio intermembrana y hasta puede bloquear la apoptosis, mientras que la sobreexpresión de FIS1 induce muerte (James et al. 2003).

En un principio la autofagia, como mecanismo celular, constituye una respuesta de preservación y recuperación de daño celular (Boya et al. 2005). El efecto de protección de la autofagia es debido a que proporciona una eficiente labor de reciclaje del material citoplasmático como orgánulos, retículo endoplásmico y mitocondrias que han sido dañadas. De hecho, las mitocondrias dañadas con bajo potencial de membrana son engullidas por el sistema de vacuolas autofágicas en un proceso controlado por la fusión y fisión mitocondrial (Twig et al. 2008), bloqueando así la activación de caspasas. Esto generaría un efecto de resistencia a la inducción de apoptosis para la mayoría de las terapias tradicionales que en su mayoría están basadas en la inducción de daño al DNA (Shimizu et al. 2004; Ravikumar et al. 2006). Se ha descubierto la existencia de proteínas como la BNIP3 (una proteína de la familia de Bcl2), que tienen la capacidad de participar en el reciclaje mediado por autofagia de las mitocondrias (Vande Velde et al. 2000; Tracy y Macleod 2007; Azad et al. 2008) y su expresión esta inducida en varios procesos en los que se genera daño mitocondrial (Kanzawa et al. 2005).

Tumorigénesis y autofagia: un equilibrio de muerte

El desarrollo de un tumor conlleva alteraciones fundamentales en los aspectos básicos de la célula tales como la proliferación, el metabolismo, la diferenciación y los programas de muerte. La autofagia tiene una implicación de gran relevancia en varios de estos aspectos. En particular, el desarrollo de tumores mamarios u ováricos en muchos casos presentan la pérdida de un alelo del gen Atg6/beclina 1 que codifica una proteína con un papel central en la generación de las vacuolas autofágicas, como se ha mencionado anteriormente. En base a la pérdida de este alelo se creía en un principio que esto reducía la muerte celular autofágica, que se producía debido a diversos al estrés al que están sometidas las células en el núcleo de un tumor (Liang et al. 1999; Mathew et al. 2009). Pero recientemente se ha demostrado que también la inhibición de la generación de vacuolas autofágicas puede, mediante la regulación de p62 (una proteína adaptadora involucrada en reciclaje de proteínas), modificar NF-KB, bloqueando la apoptosis y promoviendo así la tumorigénesis. Aunque la pérdida de un alelo de beclina 1 consigue reducir la inducción de autofagia, éstas células siguen conservando la capacidad de morir mediante autofagia (Lamparska-Przybysz et al. 2005). La conservación de la capacidad de inducir autofagia en estas células presenta una ventaja parcial para el crecimiento del tumor ya que favorecer a la tumorigénesis en varios aspectos, como la protección frente al estrés oxidativo (Chen et al. 2008), estimula la inestabilidad genómica (Mathew et al. 2007; Young et al. 2009) y protege del estrés que conlleva la pérdida de genes supresores de tumor (Tasdemir et al. 2008), sin generar la acumulación de grandes cantidades de desechos tóxicos que no le permitan sobrevivir. Por ejemplo, la alteración de la función de p53 que ocurre en algunos tumores puede generar un incremento en las vacuolas autofágicas. Además, el proceso de transformación conlleva una sensibilización a la generación de vacuolas autofágicas (Lu et al. 2008; Turcotte et al. 2008; Weihua et al. 2008), posiblemente mediado por estrés celular. Por lo tanto, podría especularse que una célula tumoral es más sensible a la muerte por autofagia que una célula normal. Desde un punto de vista terapéutico resultaría más efectivo para matar las células tumorales la estrategia de inducción de muerte mediada por autofagia que la inducción de muerte vía activación de las caspasas.

materiales y métodos

Reactivos especiales

Los reactivos especiales, que han sido utilizados en este trabajo, sus condiciones de uso y las casas comerciales en las que fueron obtenidos, son los siguientes: linamarina (lin, 50, 200, or 500 µg/ml; de Toronto Research Chemicals); glucosa oxidasa (GO, 5-5,5 mEU/ml), N-acetil-L-cisteína (NAC, 10 mM), tirón (1 mM), bafilomicina (100 nM), 3-metiladenina (3-MeA, 10mM), etopósido (Eto, 10-50 µM), trióxido arsénico (As₂O₃, 4-6 µM), estaurosporina (STS, 1 µM), 1,5-isoquinolinediol (DIQ, 300 µM), ciclosporina A (CsA, 1 µM), bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazo-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT, 200 µg/ml) y cloruro de amonio (NH₄Cl, 20 mM), todos ellos obtenidos de Sigma, St. Louis, Missouri; KCN (400 µM, Merk); z-FAfmk (50µM), pepstatina (50µM), compuesto C (10 µM) de Calbiochem; y Z-VAD-fmk, (100µM), el inhibidor de p38 (SB203580, 30 µM) y el inhibidor de JNK (SP600125, 10 µM) de Tocris, Bristol, Reino Unido.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo así como sus condiciones de uso se detallan en la siguiente Tabla I.

Antígeno	origen	referencia	dilución WB	dilución IHQ
actina	Sigma	A-2066	1/1000	
AIF	Cell Signaling	4642	1/1000	1/250
AMPK α	Cell Signaling	2532	1/1000	
AMPK α Thr172	Cell Signaling	2535	1/1000	
ATG5-ATG12	Noboru Mizushima Tokyo Medical and Dental University, Japan	Suero de Conejo	1/2500	
Bax	BD Bioscience	556467	1/1000	1/200
BCL-2	BD Bioscience	61038	1/500	
beclina-1	Santa Cruz	sc-11427	1/2000	
BNIP-3	Sigma	B-7931	1/1000	
caspasa-3 activa	Cell Signaling	9661	1/1000	
caspasa-8	Santa Cruz	sc-7890	1/500	
caspasa-12	Santa Cruz	sc-5627	1/500	
citocromo-c	BD Bioscience	556433	1/1000	
citocromo-c	BD Bioscience	556432		1/250

c-MYC	Santa Cruz	sc-40	1/500	
Hax-1	BD Bioscience	610825	1/1000	
HMGB1	Abcam	ab18256		1/300
Hsp-70	Stressgen	SPA-810	1/2000	
hTERT	Abcam		1/1000	
lamp-2	Santa Cruz	sc-18822	1/1000	
LC-3	Sigma	L7543	1/2000	
linamarasa	Monica Hudges University of Newcastle upon Tyne, Reino Unido	Suero de Conejo	1/10000	1/200
MnSOD	Stressgen	SOD-111	1/2000	1/500
p53	Santa Cruz	DOI-1	1/500	
pan-RAS	Calbiochem	OP21		
Rab 7	Ignacio Sandoval CBMSO, España	Suero de Conejo	1/1000	
tubulina	Sigma	T4026	1/1000	
Alexa-488	Invitrogen	A21202		1/500
Alexa-555	Invitrogen	A31572		1/500
Alexa-594	Invitrogen	A31573		1/500
IgG ratón-HRP	Dako		1/2500	
IgG conejo-HRP	Dako		1/2500	
IgG cabra-HRP	Santa Cruz	sc-2768	1/5000	

Plásmidos

pILE: construido por el Dr. Pedro Carmona (CBM-SO) y cedido por el autor (trabajo no publicado). Está basado en el pIRES-P (Hobbs et al. 1998) que presenta el promotor de CMV (citomegalovirus), seguido de un intrón y una región de policlonaje en la que se clona el gen *epolis* (linamarasa que lleva la señal de exportación extracelular de la eritropoietina humana) (1625 pb), seguido de un IRES (del inglés, *Internal Ribosome Entry Sequence*) y el gen *pac* (*puromycin N-acetil transferase*) (602 pb) y la señal de poliadenilación de SV40.

pCDNA3 y pCDNA3-Hsp70: vector que codifica la proteína Hsp70 humana y fue cedido amablemente por José María Requema (Centro de Biología Molecular Svero

Ochoa, CBM SO, Madrid, España) (Hunt and Morimoto 1985)

pDsRed2-Mito: vector comercial de la casa Clontech (California, EEUU) que contiene el gen de la proteína roja fluorescente DsRed2 (697 pb), que presenta una señal de localización mitocondrial procedente de la enzima citocromo c oxidasa humana (24 pb), bajo el promotor de CMV, todo ello seguido de la región de poliadenilación de SV40 y además expresa el gen *neo* (*aminoglicósido fosoforribosil transferase*) .

pGFP-LC3: vector que codifica la proteína de fusión GFP-LC-3 y fue cedido amablemente por Patricia Boya (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, Madrid, España) (Kabeya et al. 2000)

pCMVdR8.74: vector que codifica los genes estructurales de los lentivirus y fue obtenido de Didier Trono (Dull et al. 1998)

pMD2G: vector que codifica la proteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular que fue obtenido de la empresa Addgene (plásmido 12259) (Cambridge, MA, EEUU)

pLOX-TERT-iresTK: vector lentiviral comercial obtenido de Addgene (plásmido 12245) que contiene el gen de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (TERT) y el gen de la quinasa de timidinas (TK) unidos por una secuencia IRES bajo el promotor de CMV. En los LTRs (del inglés, *Long Terminal Repeats*) presenta unas secuencias LoxP que permiten la escisión controlada del transgén integrado en la célula hospedadora mediante la administración de la recombinasa Cre.

pMIG-h-c-MYC: vector lentiviral que contiene el gen *c-myc* que fue amablemente cedido por Maria Soengas (CNIO, Madrid, España) (Nikiforov et al. 2007)

pLenti-RASV12: vector lentiviral que contiene una variante activa de *ras* en cuyo gen se sustituye el aminoácido glicina en posición 12 por valina, fue cedido por Judith Campisi (Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, EEUU) (Beausejour et al. 2003)

shAtg5: vectores lentivirales comerciales que permiten la expresión de shRNAs dirigidos contra la secuencia de proteína Atg5 (shAtg5 TRCN0000150963, TRCN0000151940, TRCN0000151945, TRCN0000151947) los cuales se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Missouri, EEUU).

pLKO.1 scramble: vector lentiviral que codifica shRNA que no presenta ninguna diana en eucariotas; se obtuvo de Addgene (plásmido 1864).

pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (LvGFP): Vector lentiviral que codifica la proteína verde fluorescente o E-GFP (del inglés, *enhanced green fluorescent protein*) que fue

obtenido de Addgene (plásmido 12252) y fue utilizado como lentivirus control.

pBabe-Puro: Vector retroviral que presenta los TRLs (terminales repetidos largos) procendentes del MoMLV (virus de la leucemia murina de Moloney) y parte del gen *gag* (genes que codifican las proteínas del ensablaje del retrovirus), seguidos de una región de policlonaje, del promotor temprano de SV40 (virus 40 de los simios) y del gen que confiere resistencia a puomicina pac (N-acetil transferasa de puomicina) (Morgenstern and Land 1990)

pBabe-FoxO3A (caFoxO3) Vector retroviral derivado del pBabe-Puro que expresa una forma constitutivamente activa de FoxO3

pBabe-dnFoxO3 Vector retroviral derivado del pBabe-Puro que expresa un dominante negativo de FoxO3

Construcciones de RNA de interferencia

Dos oligonucleotidos sintéticos que reconocen una secuencia génica de AIF que es homóloga en ratón (DQ 016497) y humano (NM 004208) fueron clonados en el plásmido pSuper.neo (Oligoengine™) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron: AIFi1, 5'GCCGTACTGGCATCAGTCA3'; AIFi2, 5'GGTAGAAACTGACCACATA3' y SNE (secuencia no eucariótica), 5'TCAAGGAGGTGTGATCCTA3'.

Vectores virales

Adenovirus

Los adenovirus defectivos portadores del gen de la linamarasa, *adenolis*, fueron generosamente cedido por la empresa Crucell, Leiden, Holanda.

Lentivirus

Los vectores lentivirales pseudotipados se produjeron utilizando los reactivos y protocolos de Didier Trono, con las siguientes modificaciones: Las células 293T se transfectaron transitoriamente con 5 µg del plásmido lentiviral de interés, 5 µg del plásmido de empaquetamiento pCMVdR8.74 y 2 µg del plásmido pMD2G que codifica

la proteína G de la envuelta de VSV (virus de la estomatitis vesicular) usando el reactivo Lipofectamina plus siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Invitrogen). Se utilizaron los virus producidos durante 20-24 h y aislados en el sobrenadante de las células pasadas 48 h desde la transfección.

Retrovirus

Las partículas retrovirales se obtuvieron por transfección transitoria de las células phoenix-Ampho con 5 µg del correspondiente vector retroviral con lipofectamina plus (Invitrogen). El sobrenadante retroviral fue recogido como se detalló para el caso de los lentivirus.

Cultivos celulares

Medios y condiciones de cultivo

Las células utilizadas se detallan en la Tabla II y se cultivaron en incubadores mantenidos a 37°C con un 7% de CO₂ y un 97% de humedad relativa en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) o MEM (medio esencial mínimo), suplementados con L-glutamina 200 mM, mezcla de antibióticos (0,1 mg/ml de estreptomicina y 63,2 mg/ml de penicilina) o gentamicina 0,05 mg/ml, aminoácidos no esenciales (44 mM de L-Ala; 45 mM de L-Asn; 40 mM de L-Asp; 40 mM L-Glu y 30 mM de L-Pro), antimicótico 0,02% y 10 ó 20% de suero fetal de bovino (SFB). Las líneas celulares derivadas de MCF10A se cultivaron siguiendo las recomendaciones de Robert Weinberg en medio DMEM:F12 (1:1) suplementado con insulina (GIBCO), EGF (Tocris), hidrocortisona (Calbiochem) y 5% de suero de caballo. Los sueros fueron previamente descomplementados mediante incubación a 56°C durante 30 min y sometidos a filtración (tamaño del poro de 0,22 µm).

Células

Las células utilizadas en esta tesis fueron las siguientes específicas en la siguiente tabla II.

	Líneas celulares	Origen	Medio de cultivo	Procedencia	Referencias
Línea canina	W&W	Glioblastoma	MEM 20%SFB DMEM 10%SFB	Dr. John Hilton	(Wodinsky, <i>et al</i> , 1969)
Líneas tumorales humanas	U-373 MG	Glioblastoma	DMEM 10%SFB	ATCC HTB-17	(Ponten and Macintyre 1968)
	U-87 MG	Glioblastoma	DMEM 10%SFB	ATCC HTB-14	(Beckman <i>et al</i> . 1971)
	MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamario	DMEM 10%SFB	ATCC HTB-26	(Cailleau <i>et al</i> . 1974)
	HeLa	Adenocarcinoma de cervix	DMEM 10%SFB	ATCC CCL-2	(Gey, <i>et al</i> , 1952)
	MCF7	Adenocarcinoma mamario	DMEM 10%SFB	ATCC HTB-22	(Sugarman <i>et al</i> . 1985)
Líneas humanas	MCF10A	Epitelio mamario	DMEM:F12, insulina, EGF, hidrocortisona y 5% SC	Dr.Federico Mayor (CBM-SO) ATCC CRL-10317	(Debnath <i>et al</i> . 2003)
Líneas de fibroblastos embrionarios murinos	MEFs WT	Salvajes	DMEM 10%SFB	Antonio Ruiz-Vela (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid)	(Ruiz-Vela <i>et al</i> . 2005)
	MEFs bax/bak ^{-/-}	Knock out para bax/bak			
	MEFs caspasa9 ^{-/-}	Knock out para caspasa 9		Dr. Noboru Mizushima	(Kuma <i>et al</i> . 2004)
	MEFs Atg5 ^{-/-}	Knock out para Atg5		Dr. JS Seo	(Shim <i>et al</i> . 2002)
	MEFs hsp70 ^{-/-}	Knock out para hsp70			
Líneas empaquetadoras	HEK 293T	Células epiteliales de riñón embrionario humano transformadas con antígeno T de SV40	DMEM 10%SFB	Dr. Alfredo Giménez-Cassina (CBM-SO) ATCC CRL-11268	(Pear <i>et al</i> . 1993)
	Phoenix GP	Células epiteliales humanas pseudotipadas con la proteína G	DMEM 10%SFB	Dr. Gary Nolan	Nolan, G <i>et al</i> UNIT 10.17C Curr Prot in immunol. 1999
Explantos pacientes	GB-LP-1-5	Glioblastomas	MEM 20%SFB DMEM 10%SFB	Pacientes Hospital La Paz	Gargini, <i>et al</i> , sin publicar
	GB-RC-1	Glioblastomas		Pacientes Hospital Ramón y Cajal	

Tabla II: Líneas celulares

Obtención de cultivos primarios de explantes de tumores

Las biopsias de los tumores procedentes de animales de experimentación o de pacientes se mantuvieron en medio MEM con el 20% de SFB a 4°C hasta su procesamiento. Las muestras se cortaron en trozos de 1 mm³ aproximadamente en condiciones de esterilidad. Posteriormente se les añadió MEM con el 20% de SFT suplementado con colagenasa (106 UE/ml), tampón HEPES 0,1 M pH 7,4, fungizona (0,5 µg/ml) y DNAsa (0,02%) y se incubó durante 16 h a temperatura ambiente. A continuación se eliminaron los fragmentos grandes no digeridos por decantación y se recogieron las células por centrifugación. Las células se sembraron en MEM con el 20% de SFT hasta establecer un cultivo. Una vez establecido el cultivo, tras varios pases, el medio fue sustituido por DMEM con 10% SFB. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Institucional del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, y se obtuvo un consentimiento informado por escrito firmado por cada paciente.

Transfección de células

Se utilizó el lípido catiónico comercial lipofectamina plus (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial, para lo cual se emplearon 2 µg de DNA de interés, 12 µl de lipofectamina y 8 µl del reactivo plus.

En el caso de las células que expresan establemente linamarasa, las distintas líneas celulares (W&W, U-87 MG, U-373 MG, MDA-MB y MCF7) fueron transfectadas con el plásmido pILE y se seleccionaron suplementando el medio con 1-2 µg/ml de puromicina.

Para la obtención de células con mitocondrias rojas se transfectaron distintas líneas (W&W y U-87 MG) con el plásmido pDsRed2-Mito y posteriormente fueron seleccionadas en presencia de G418 (800 µg/ml)

Las células MCF10A que expresan las diferentes variantes de FoxO3 fueron resultado de la transfección de los plásmidos pBabe-Pur (control), pBabe-FoxO3A (caFoxO3) y pBabe-dnFoxO3 y posterior selección de las células con 0,5 µg/ml de puromicina

Determinación de la supervivencia celular

Las células fueron tratadas como se detalla para cada experimento. Posteriormente, el porcentaje de supervivencia se determinó usando MTT, para lo cual las células se incubaron entre 1 y 4 h con medio de cultivo suplementando con 200 µg/ml de MTT, tras lo cual el medio se sustituyó por DMSO y se midió la absorbancia 570 nm.

Infección con adenolis *in vitro*

Se utilizaron adenovirus defectivos en E1 que codifican para el gen de la linamarasa bajo el promotor de citomegalovirus (*adenolis*) obtenidos de la empresa Crucell (Holanda). Se sembraron 10^5 células en tubos con un lado plano y tampón de rosca (Nunc) o bien 5×10^4 células sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos y se infectaron a distintas multiplicidades de infección (MOIs: 0, 0,2, 1, 10 o 100 UI/célula) con *adenolis* (1.6×10^{11} UI/ml). Pasadas 24h las células fueron tratadas con linamarina (500 μ g/ml) y pasadas 96 h se determinó la supervivencia y la concentración de cianuro como se describió anteriormente. Las células sembradas en cubreobjetos, pasadas 48 h desde la infección, se procesaron para realizar una inmunofluorescencia detectando la linamarasa.

Inmunofluorescencias

Las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles que se colocaron en una placa de 24 pocillos y fueron tratadas según los requerimientos específicos de cada experimento. Pasado el tiempo de incubación apropiado para cada ensayo se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se permeabilizaron durante 10 min con PBS suplementado con tritón X-100 o dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% y se bloquearon incubando 20 min con PBS con tritón X-100 al 0,1% con un 1% de albúmina de suero bovino (ABS) o bien con PBS con un 10% de suero fetal de ternera. A continuación, se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C y posteriormente con la dilución correspondiente del anticuerpo secundario 45 min a temperatura ambiente. Adicionalmente, en los casos indicados, se tiñeron los núcleos incubando durante 30 min con una dilución 1/500 de To-Pro-3 (Molecular Probes). Las muestras se lavaron 2 veces con PBS y una con H₂O destilada y se montaron sobre portaobjetos, utilizando como medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates Inc.), Mowiol-DABCO o Prolong Gold Antifade (Invitrogen) para su observación por microscopía de fluorescencia (Zeiss).

Análisis de las modificaciones estructurales de la mitocondria

Las células se transfectaron con el plásmido pDsRed2-Mito (Clontech, BD Bioscience, CA) que contiene el gen de una proteína fluorescente roja (DsRed2) que se expresa exclusivamente en mitocondrias como se detalló anteriormente. Se obtuvieron clones de expresión estable que fueron tratados según las exigencias de cada experimento tras lo cual se fijaron con paraformaldehído al 4%. Se realizó, entonces, una tinción

de los núcleos con To-Pro-3 (Molecular Probes, Eugene, OR) con una dilución 1/500 durante 30 min. Las células se analizaron con un sistema confocal Radiance2000 (BioRad) acoplado a microscopio invertido Axiovert S100 TV (Zeiss) tomando 3 planos consecutivos a una distancia de 0,2 μm en los filtros rojo y azul, que se mezclaron y se sometieron a un proceso de deconvolución usando el algoritmo clásico MLE-TIME con el programa Huygens Professional 2.5.1a.<2>.

Marcaje de autofagosomas

Las células se transfectaron con un plásmido de expresión de GFP-LC3 (Kabeya et al. 2000), Pasadas 24 h las células se trataron como se indica en cada experimento y el patrón de GFP-LC3 se observó en un microscopio de fluorescencia Axiovert200 (Zeiss) o, en el caso de la colocación con mitocondrias (en los que se usaron células previamente transfectadas de forma estable con pDsRed2-mito), un sistema confocal Radiance 2000 (Bio-Rad) acoplado a un microscopio invertido Axiovert S100 TV (Zeiss).

Medición de estrés oxidativo

Las células, tratadas como se indica para cada caso, se recogieron y se resuspendieron en tampón MIB (68 mM sacarosa, 10 mM hepes-KOH pH 7.4, 70 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF y 2 μM aprotinina) y, posteriormente, se incubaron con 4 μM dihidroetidio (2-HE, Calbiochem, San Diego, CA) durante 30 min a 37°C en la oscuridad. La adquisición y análisis de datos se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (DB Biosciences, San Diego, CA) con el programa Cell Quest.

Medición del potencial de membrana

A las células tratadas como se indica en cada ensayo, se les realizó un cambio de medio añadiendo 50 nM de DiOC₆(3) (Molecular Probes, Eugene, OR) y se incubaron a 37°C durante 30 min. Posteriormente se recogieron las células, se lavaron con PBS y se les añadió 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Ioduro de propidio. La adquisición y análisis de datos se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (DB Biosciences) con el programa Cell Quest. El potencial de membrana se representa como el porcentaje de células positivas para la tinción con DiOC₆(3) que presentan cada una de las muestras respecto a un control de células sin tratar.

Análisis del tipo de muerte por citometría de flujo (Anexina V-FITC/IP o Anexina V-PE/7-AAD)

Las células se trataron como se indica en cada caso y, adicionalmente, se realizaron controles de apoptosis, irradiando estas células con 12,5 (W&W/*is*) y 17,5 J/m² (U-87 MG/*is*). Transcurrido el tiempo determinado para cada ensayo las células se recogieron por tripsinización y el precipitado de células se lavó primero con PBS y luego con tampón de unión (Hepes/NaOH 0,1 M pH 7,4, NaCl 1,4 M y CaCl₂ 25 mM). Finalmente, las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión suplementado con 5 µl de anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) y 2,5 µg/ml de Ioduro de propidio, en las células W&W/*is*, o bien con 5 µl de anexina V-PE (ficoeritrina) y 5 µl de 7-AAD (7-amino-actinomicina D), en el caso de las células U-87 MG/*is*, U-373 MG/*is* y MDA-MB/*is* ambos de BD Biosciences (San Diego, CA). Las muestras fueron incubadas durante 15 min en oscuridad. La adquisición y análisis de datos se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) con el programa Cell Quest. Consideramos células apoptóticas tempranas a aquellas que presentaban marcación positiva sólo para anexina V-FITC y apoptóticas tardías o necróticas a aquellas que son positivas para ambos marcajes.

Ensayo de formación de colonias

Las células se trataron durante 40 h con 0,5 mg/ml de linamarina y 5,5 mUE/ml de glucosa oxidasa en presencia o ausencia de NH₄Cl (20 mM). Tras este tratamiento, las células se levantaron y se sembraron 5x10⁴ células en placas de 6 pocillos. Tras una semana las células se tiñeron con azul de metileno durante 45 min y luego se lavaron con PBS y luego de este paso se fotografiaron.

Proteínas

Obtención de extractos de proteínas totales

Las células se trataron según correspondía en cada caso, fueron recogidas y el precipitado se resuspendió en un tampón de lisis (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 300 mM, SDS 0,5% y tritón X-100 1%) y se incubó 20 min a 95°C. Para los controles de apoptosis se sembraron 10⁶ células en placas p100 que fueron irradiadas con 16,7 o 20 J/m². Pasadas 24 h, éstas fueron procesadas del mismo modo para obtener los homogeneizados.

Preparación de fracciones enriquecidas citosólicas y mitocondriales

Las células se lavaron con PBS a 4°C y se incubaron en hielo durante 10 min, posteriormente se resuspenden en un tampón isotónico (sacarosa 250 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Na-EDTA 1 mM, ditio-treitol 1 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo 0,1 mM y HCl-Tris 10 mM a pH 7,4) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Basel, Suiza). Tras 80 pases en un homogenizador tipo Dounce, las células que no se rompieron fueron precipitadas por centrifugación a 30 x g durante 5 min. La fracción de mitocondrias se obtuvo por centrifugación a 14000 x g durante 20 min, y el sobrenadante fue considerado el citosol.

Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)

La concentración de las proteínas fue determinada utilizando el sistema “DC protein assay” (BioRad). Las proteínas fueron separadas en un gel SDS-poliacrilamida al 12% o 15% y posteriormente, transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Las membranas fueron incubadas primero con los anticuerpos primarios indicados y posteriormente con los secundarios acoplados a peroxidasa (ver Tabla anticuerpos). La luminiscencia se aumentó utilizando el reactivo de quimioluminiscencia (ECL)-basado en el *Kit* de detección (Pierce, Rockford, IL).

Tratamiento de los ratones

Se utilizaron ratones atímicos de la cepa, BALB/c nu/nu, los cuales fueron inoculados subcutáneamente en ambos flancos con 1x10⁶ células MCF7/*lis* o 1x10⁶ células U-87 MG/*lis* infectadas con un lentivirus que lleva una secuencia control o uno que lleva un shRNA contra Atg5 (n=6 por grupo). Pasados 5 días (MCF7/*lis*) o 6 días (U-87 MG/*lis*), los animales fueron tratados diariamente con inyecciones intratumorales de lin (5 mg) y GO (2 EU) en el tumor del flanco derecho mientras que el izquierdo se dejó sin tratar. En otro grupo de experimentos, 14 ratones desnudos fueron transplantados con 1x10⁶ células U-87 MG y pasados 3 días cuando los tumores alcanzaban un tamaño medio de 40-50 mm³ uno de los tumores se trató intratumoralmente con 4 ciclos de siguiente protocolo: 10⁹ IU de adenol/*is*, y 48 h más tarde, un tratamiento de dos días con 5 mg de linamarina y 2 EU de glucosa oxidasa por día. Todos los tratamientos se realizaron bajo anestesia general con isoflurano (Baxter, Valencia). El tamaño de los tumores se estimó mediante la formula $[\pi/6 \text{ (altura x ancho x largo)}]$, donde cada medida se calculó mediante un calibrador digital. Para el cuidado y tratamiento de los animales hemos seguido estrictamente los protocolos y legislación nacional en vigor (Real

Decreto Español, Boletín Oficial del Estado 1201/2005, publicado el 21 de octubre de 2005), además de los determinados por la Unión Europea (2003/65/CE del Parlamento y Consejo Europeo de julio de 2003)

Análisis estadístico de los datos

A partir de los resultados obtenidos en cada experimento se calcularon los valores medios y las desviaciones o errores estándar, según se indique en cada caso. La comparación estadística de los grupos de datos se realizó mediante el análisis de la *t* de *Student* y las diferencias se representan con la significancia estadística o *P* valor.

resultados

El sistema linamarasa/linamarina/glucosa oxidasa genera una rápida y eficiente muerte de las células tumorales

El descubrimiento y desarrollo de agentes con aplicación antitumoral es uno de los campos de investigación más amplios (Lengauer et al. 2005). Muchos compuestos han sido evaluados para inducir una respuesta mortal en las células tumorales sin que ello afecte la función de algún órgano. Así, compuestos de lo más diverso han sido utilizados buscando un efecto antitumoral (Ma y Adjei 2009).

Desde hace tiempo se había observado que la mitocondria es un orgánulo fundamental para la célula en el aspecto metabólico (Kroemer y Pouyssegur 2008) así como en la muerte celular (Green y Kroemer 2004). Debido a esto, nosotros hemos intentado desestabilizar la función de la mitocondria y con ello generar un efecto terapéutico de aplicación contra el cáncer.

Para analizar el efecto de citotoxicidad de sustancias que dañan la mitocondria, nos hemos centrado en aquellos productos que bloquean la cadena de transporte de electrones, tales como, rotenona (complejo I), antimicina (complejo III), azida sódica, cianuro (complejo IV), y por último cianuro en combinación con glucosa oxidasa (enzima que cataliza la transformación de la glucosa en peróxido de hidrógeno y ácido glucurónico). Por otro lado, también utilizamos un inhibidor de la ATPasa mitocondrial como la oligomicina. Observamos que la mayoría de ellos han demostrado tener una alta citotoxicidad en un modelo de glioblastoma agresivo, U-87 MG (Figura 6 A-E). Un análisis detallado revela que la antimicina sólo tiene un efecto moderado hasta 100 μ M, y el inhibidor del complejo I, la rotenona, a pesar de tener una alta toxicidad a baja concentración, su efecto tóxico no aumenta a mayor concentración, manteniéndose a niveles estables entre 1 a 10 μ M. Por el contrario, los demás agentes presentan una linealidad de inducción de muerte respecto al incremento en su concentración. La combinación de cianuro de potasio con glucosa oxidasa se evaluó para verificar que pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno aceleran la muerte a bajas cantidades de cianuro (Figura 6 D y E).

A pesar de la eficiencia en la inducción muerte de los distintos inhibidores de la cadena de transporte de electrones, su aplicación en tratamientos contra el cáncer se ve imposibilitada debido a la necesidad de utilizar altas concentraciones, lo que podría ocasionar efectos nocivos secundarios en diversos órganos.

Para poder llevar a cabo una aplicación terapéutica controlada, nosotros hemos utilizado un sistema suicida basado en la utilización de la linamarasa y linamarina. El sistema se basa en la transformación enzimática mediada por la linamarasa del sustrato inocuo linamarina, para producir cianuro y glucosa. En este sistema no es

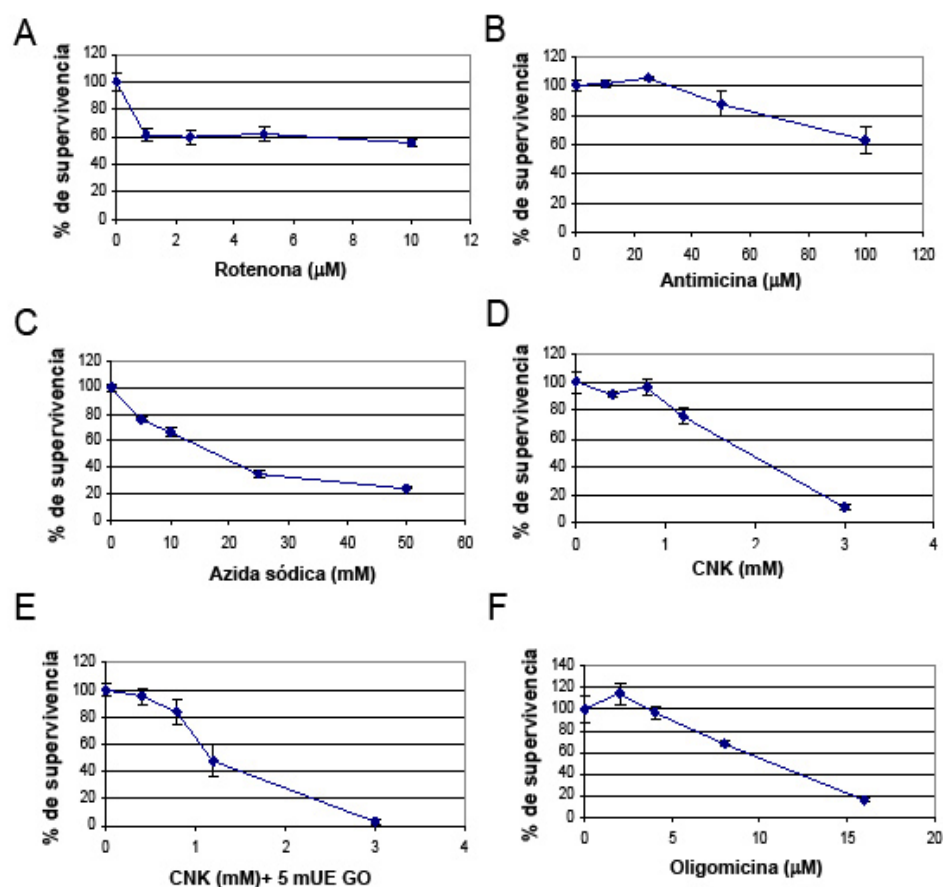


Figura 6: Sensibilidad a distintos inhibidores de la cadena transportadora de electrones. Supervivencia de las células U-87 MG frente a concentraciones crecientes de (A) rotenona (μM), (B) antimicina (μM), (C) azida sódica (mM), (D) cianuro potásico (mM), (E) cianuro potásico (mM) combinado con 5 UE/ml de glucosa oxidasa y (F) oligomicina ($\mu\text{g/ml}$). Las medidas se realizaron por MTT a las 24 h de añadir el compuesto correspondiente.

necesario producir altas cantidad de cianuro para generar un efecto terapéutico, sino que se ha observado que es más eficiente a nivel terapéutico la producción crónica como la generada en el sistema *lis/lin* (Cortes et al. 1998).

Hemos utilizado como vectores de expresión del gen de la linamarasa un plásmido de expresión en eucariotas, pIRES-puro, o un adenovirus. Éstos se han utilizado indistintamente para efectuar la transferencia génica tanto *in vitro*, como *in vivo* o para generar líneas de expresión estable (García-Escudero et al. 2008).

El sistema linamarasa/linamarina (*lis/lin*) tiene un efecto colateral importante ya que la producción de cianuro es mayoritaria en el ambiente extracelular, debido a que la linamarasa es exportada al exterior de la célula, y, además, el cianuro es una molécula difusible, con capacidad de alcanzar a todas la células del entorno donde se produce (Cortes et al. 2002), haciendo que este sistema pueda inducir muerte en toda la masa

tumoral y así ser eficiente para su aplicación antitumoral.

Se ha utilizado un sistema adenoviral que codifica el gen de la *linamarasa* (*adenolis*), mediante el cual se han conseguido transducir una gran variedad de células tumorales como se demuestra por su sensibilidad tras la adición de linamarina, como se observa en la [Figura 7A-D](#).

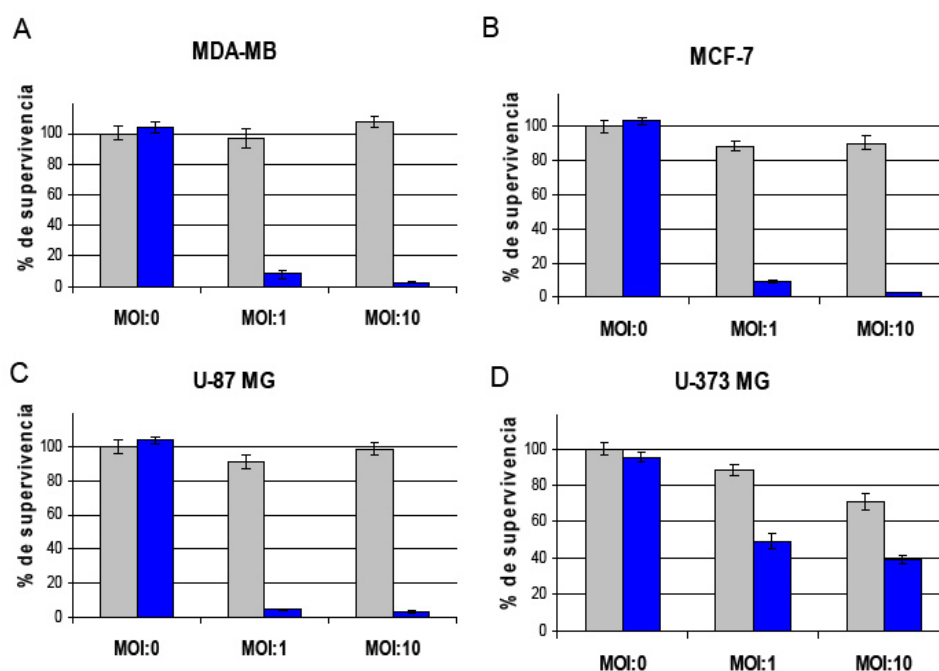


Figura 7: Sensibilidad de distintas líneas tumorales humanas al sistema *lis/lin*. Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las líneas (A) MDA-MB, (B) MCF-7, (C) U-87 MG y (D) U-373 MG infectadas con adenolis (MOI: 0, 1 y 10) a las 96 h en ausencia (gris) o en presencia (negro) de 0,5 mg/ml de linamarina. Las gráficas muestran las medias y desviaciones estándar de 4 muestra independientes.

Aunque el sistema de producción de cianuro *lis/lin* es eficiente para matar las células *in vitro* el efecto terapéutico *in vivo* sólo era modesto en modelos de xenotransplante de líneas celulares humanas. Para mejorar el efecto terapéutico, hemos combinado el sistema *lis/lin* con cantidades sub-tóxicas de glucosa oxidasa, para potenciar el efecto de muerte, como se había observado para el cianuro en la [Figura 6E](#). En un experimento en el que se utilizaron células U-87 MG que expresaban establemente el gen de la linamarasa, por transfección con el plásmido p-Linamarasa-IRES-puro (pILE) puede observarse en la [Figura 8](#), que se produce un adelantamiento de la muerte de 72h en *lis/lin*/GO con respecto a *lis/lin* (*lis*=linamarasa, *lin*=linamarina y GO=glucosa oxidasa).

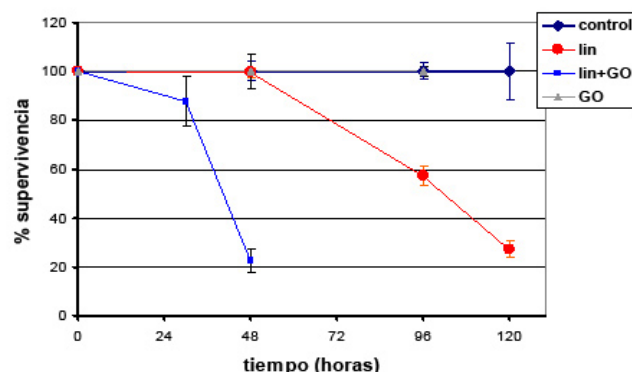


Figura 8: Comparación de los sistemas *lis/lin* y *lis/lin/GO* en las células U-87 MG. Porcentaje de supervivencia medido por MTT a lo largo del tiempo de las células U-87 MG/*lis* tratadas con linamarina (lin; 0,5 mg/ml), glucosa oxidasa (GO; 5 mUE/ml) o la combinación de ambos. Se representan los valores medios y las desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

Por ejemplificar, en el glioblastoma de perro W&W/*lis*, que expresaba establemente la linamarasa, al estudiar la sensibilidad frente a concentraciones ascendentes de sustrato observamos un $IC_{50}=250 \mu\text{g/ml}$ de linamarina a las 48 h del tratamiento, en cambio la cantidad se reduce cuando se le combina con glucosa oxidasa, en este caso el IC_{50} es de $50 \mu\text{g/ml}$ de linamarina, también a las 48 h (García-Escudero et al. 2008).

Adicionalmente se ha evaluado el sistema *lis/lin/GO* en células U-87 MG, utilizando el sistema adenoviral de expresión de linamarasa (adenol*is*). Como se observa en la Figura 9A, el sistema combinado genera una muerte cercana al 100% de células de glioblastoma en 48 h, sin que el adenovirus genere un efecto tóxico en las células. Esta aclaración es debida al hecho de que los adenovectores derivados del adenovirus humano tipo 5 pueden ser tóxicos para determinados tipos celulares (Marcellus et al. 1998). Esto puede observarse en la Figura 7D, para las células U-373 MG, donde el adenovirus genera un efecto tóxico.

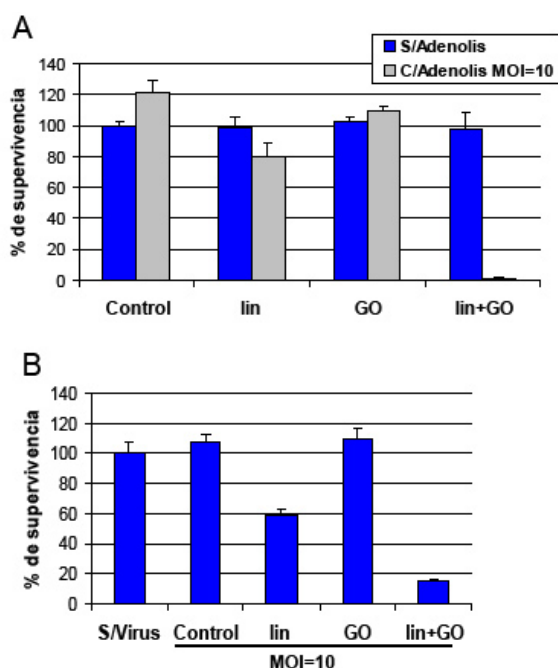


Figura 9: Sensibilidad comparada de las terapias *lis/lin* y *lis/lin/GO* mediadas por adenovirus. (A) Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las células U-87 MG no infectadas (azul) o infectadas con adenolis (MOI: 10, gris) a las 48 h de tratamiento con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml) o la combinación de ambas. (B) Ejemplo de porcentaje de supervivencia de un explante de un paciente GB-LP-1 infectado con adenol*is* (MOI: 10) y tratado con lin (0,5 mg/ml), GO (2 mUE/ml) o la combinación de ambas anteriores comparado con las células sin infectar. Las gráficas muestran las medias y desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

Por otro lado, hemos analizado si este sistema era capaz de matar un cultivo de células de un explante de un glioblastoma humano derivado de un paciente. Como puede observarse en la [Figura 9B](#), este sistema tiene una eficiencia de muerte comparable en líneas celulares establecidas como en explantes de pacientes humanos *in vitro*, lo cual nos acercaría a una posible aplicación en una terapia antitumoral.

El potencial terapéutico del sistema combinado *in vivo* se evaluó en modelos de xenotransplantes utilizando las líneas tumorales humanas de carcinoma de mama (MCF7/*lis*) y de glioblastoma (U-87 MG). En la [Figura 10A](#) los ratones fueron inoculados con células MCF7 que expresaban establemente la linamarasa y cuando los tumores alcanzaban un tamaño aproximado de 50 μm fueron tratados diariamente con 5 mg de linamarina y 2UE de GO. Pudimos observar que se producía una reducción significativa del tumor tratado a partir del día 10 de tratamiento ($P=0,00324$). Por otro lado, en un intento de acercamiento a lo que podría ser una aplicación terapéutica, se utilizó la estrategia con el adenovector que codifica el gen de la linamarasa (*adenolis*) como vector de la terapia en un modelo de xenotransplante de células U-87 MG en ratones inmunodeficientes. Para este ensayo el tratamiento consistió en 4 ciclos de inoculación con el *adenolis* 10^9 UI, y, tras 48 horas, seguido por el tratamiento de dos días con 5 mg de linamarina y 2 UE (Unidades enzimáticas) de glucosa oxidasa diaria inyectadas intratumoralmente ([Figura 10B](#)). En este caso el tratamiento conseguía una reducción significativa del tumor a día 15 ($P=0,00078$), resultado que confirma otros previamente publicados por nuestro grupo (García-Escudero et al. 2008)

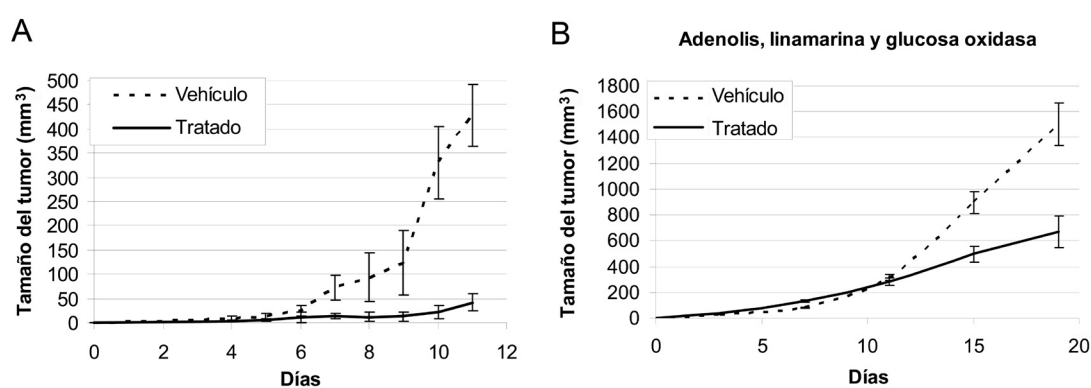


Figura 10: Terapia *lis/lin/GO* xenotransplantes de células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes. (A) Crecimiento de los tumores de células MCF-7/*lis* en los flancos de ratones en los que un tumor fue tratado diariamente con lin (5 mg) y GO (2 UE) (línea continua) y el otro se dejó sin tratar (línea discontinua). Las gráficas muestran las medias y el error estándar del volumen del tumor de 8 animales independientes. (B) Crecimiento de los tumores en ratones transplantados con células U-87 MG que fueron tratados con *adenolis* (10^9 UI), lin y GO como se detalló para el apartado A (línea continua) o bien se dejaron sin tratar (línea discontinua). Las gráficas muestran las medias y las desviaciones estándar del volumen del tumor de 14 ratones independientes. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

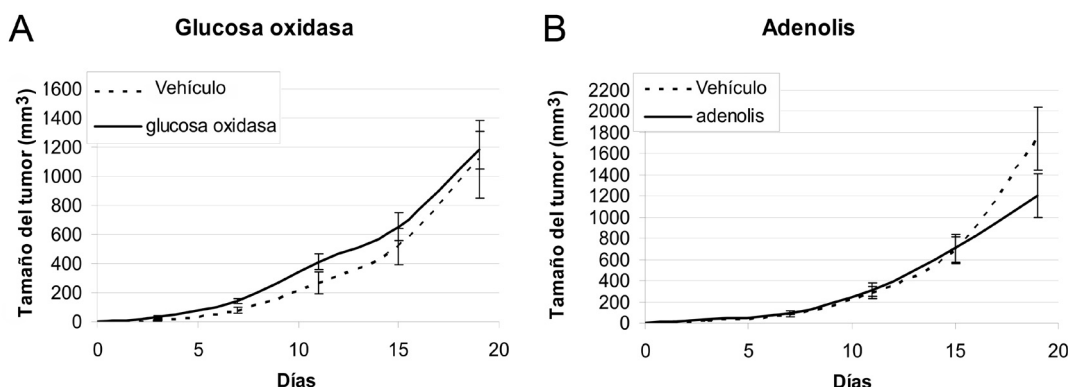


Figura 11: Tratamientos control en ratones inmunodeficientes. (A) Crecimiento de los tumores de células U-87 MG inoculados en ratones cuando uno de los dos tumores era tratado sólo con glucosa oxidasa (2 UE) o (B) sólo con adenolis (10^9 UI) (línea continua) y el otro se dejaba sin tratar (línea discontinua). Las gráficas muestran el volumen medio de los tumores y los errores estándar de 8 animales independientes.

Adicionalmente, se realizaron tratamientos control de modo similar al utilizado en la Figura 10B, pero en este caso los ratones fueron tratados únicamente con adenolis (Figura 11A) o con glucosa oxidasa (2UE/día, Figura 11B).

Caracterización morfológica de la muerte inducida por el sistema combinado *lis/lin*/GO

Al comparar los tratamientos de *lis/lin* con *lis/lin*/GO en células de glioblastoma de perro W&W se observó que la muerte cambiaba de un perfil de necrosis con ruptura

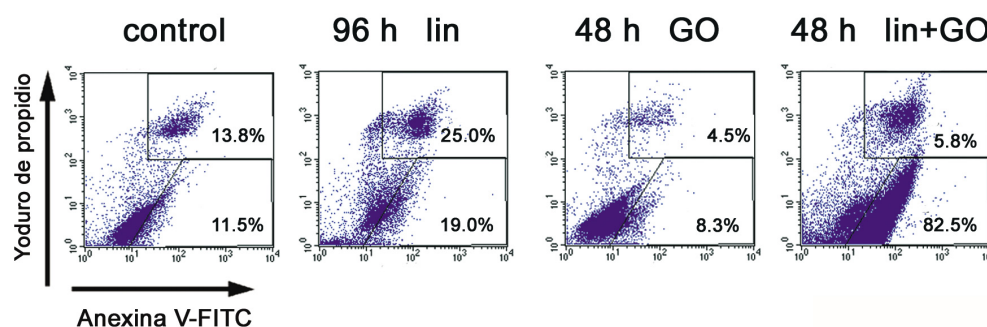


Figura 12: Caracterización de la morfología de muerte tras la terapia en un glioblastoma canino. Representación del marcaje con anexina-V FITC y yoduro de propidio por citometría de flujo de células W&W/*lis* tratadas durante 96 h con lin (0,5 mg/ml) o durante 48 h con GO (5 mUE/ml) o la combinación lin y GO. Se muestran los porcentajes de células que presentan sólo marcación para anexina-V (morfología de muerte apoptótica) y los que presentan marcación para anexina-V y yoduro de propidio (morfología de muerte necrótica o apoptosis secundaria).

de la membrana plasmática a uno con la membrana plasmática intacta. La [Figura 12](#) muestra que el tratamiento de 96 h con linamarina sola en células W&W/*lis* genera un patrón de anexina V⁺/yoduro de propidio⁺ (IP) de perfil necrótico con ruptura de membrana plasmática. Por el contrario, la exposición al sistema combinado *lis/lin/GO* produce un cambio a un perfil sin ruptura de membrana plasmática anexina V⁺/IP⁻. Este resultado inesperado fue verificado mediante otro ensayo en el que se evaluó mediante inmunofluorescencia el patrón de la proteína HMGB1, la cual, en condiciones apoptóticas, es retenida dentro del núcleo y, en la situación necrótica, es decir, con ruptura de membrana plasmática, se libera fuera de la célula perdiendo su tinción (Bustin 2002; Scaffidi et al. 2002). El resultado que se observa en la [Figura 13A-B](#) refuerza la idea de que el sistema *lis/lin* produce una ruptura de membrana plasmática con un porcentaje similar al observado por citometría de flujo en la [Figura 12](#). La cuantificación de células con tinción difusa de HMGB1 de los tratamientos con *lis/lin* o *lis/lin/GO* se representa en la [Figura 13C y D](#), evidenciando que en el primero se produce necrosis

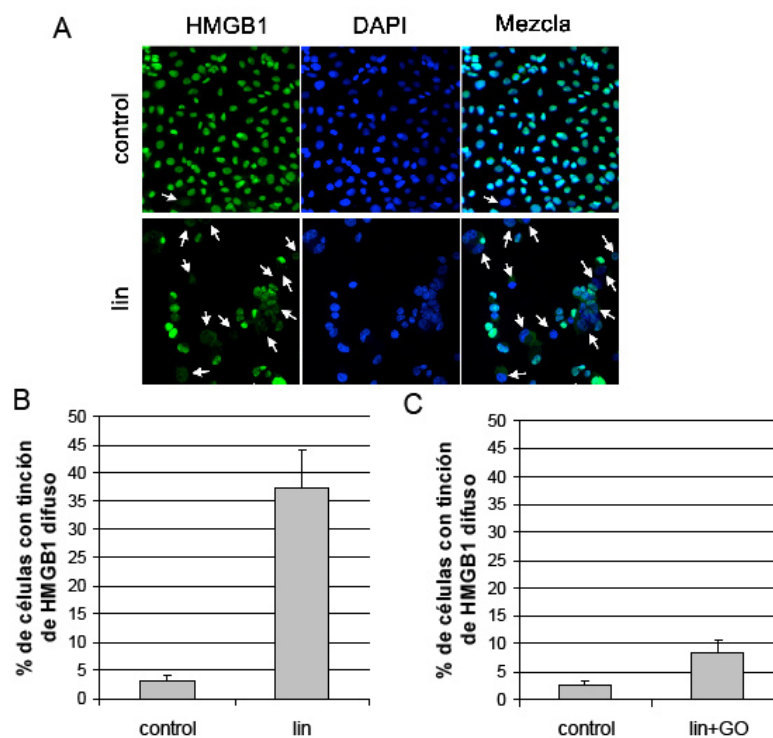


Figura 13: Caracterización de la necrosis inducida por el sistema *lis/lin* en un glioblastoma canino. (A) Imágenes de fluorescencia representativas del patrón de HMGB1 (verde) y los núcleos marcados con DAPI (azul) en células W&W/*lis* control y tratadas con lin (0,5 mg/ml) durante 96 h. Las flechas señalan núcleos que han perdido el marcaje de HMGB1. (B) Cuantificación del porcentaje de núcleos que han perdido la tinción de HMGB1, lo que representa el porcentaje de necrosis, en células tratadas con lin (0,5 mg/ml) lin durante 96 h o con la combinación de lin y (C) GO (5 mEU/ml) durante 40 h.

y que en el segundo el porcentaje necrótico es bajo, similar al que normalmente se produce en cultivos celulares.

Una situación similar se encontró cuando se trataron líneas celulares humanas de glioblastomas con el sistema *lis/lin/GO*. En el caso de las células U-87 MG se producía una muerte mayoritariamente anexina⁺/IP⁻, sin ruptura de membrana plasmática (Figura 14A, fila superior). Por el contrario, en las células U-373 MG el sistema combinado genera una muerte con ruptura de la membrana plasmática con un perfil anexina⁺/IP⁺ (Figura 14A, fila inferior). Por lo tanto, en glioblastomas humanos tratados con *lis/lin/GO* el cambio de perfil de la tinción de anexina/IP se observa al cambiar el tipo celular, en lugar de al cambiar de sistema *lis/lin* al *lis/lin/GO*, como ocurría en el glioblastoma canino. A continuación, intentamos bloquear la muerte con perfil necrótico observada en las células U-373 MG utilizando el compuesto necrostatina 1 que inhibe la función de RIP1.

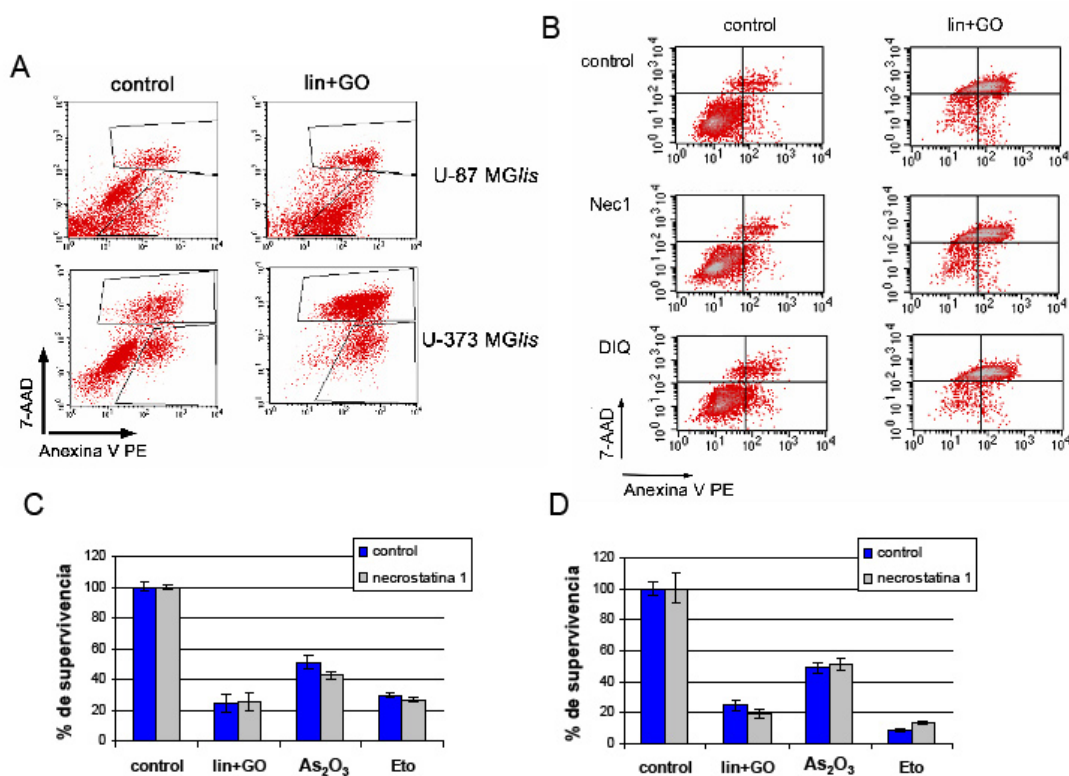


Figura 14: Morfología de muerte en el sistema *lis/lin/GO* en glioblastomas humanos. (A) Representación del marcaje con anexina-V PE y 7-AAD por citometría de flujo en células U-87 MGlis (arriba) y U-373 MGlis (abajo) tratadas con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml) durante 72 h. (B) Citometría de flujo del marcaje anexina-V PE y 7-AAD en células U-373 MG, donde estas células fueron inducidas a morir con lin y GO, en presencia DMSO (control), necrostatina 1 o DIQ (1,5-isoquinolinediol). Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las células U-87 MGlis (B) o U-373 MGlis (C) tratadas durante 48 h con lin y GO como en A y con As₂O₃ (6 μM) y etopósido (Eto, 50 μM) y expuestas a necrostatina 1 (40 μM). Las gráficas muestran los valores medios y desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

Debido a que recientemente se ha demostrado que la necrostatina 1 puede inhibir una serie de tipos de muerte con perfil necrótico, como la isquemia, (Degterev et al. 2005; Degterev et al. 2008) o la muerte que ocurre cuando se estimulan los receptores de tipo de TNF en presencia de inhibidores de caspasas, denominada necroptosis (Hitomi et al. 2008). El análisis por citometría de flujo con anexina V-PE y 7-AAD de las células U-373 MG tratadas con el sistema combinado *lis/lin/GO*, en presencia de necrostatina 1 y DIQ (1,5-isoquinolinediol) se muestra en la [Figura 14B](#). Este análisis demuestra que la necrosis generada por el sistema combinado en las células U-373 MG no puede ser bloqueada por necrostatina 1, ni por el inhibidor de PARP1, DIQ, debido a que tampoco afectan el perfil de muerte. Adicionalmente, en las células U-373 MG y en las U-87 MG ([Figura 14C y D](#), respectivamente) la necrostatina 1 no afectaba la viabilidad de las células tratadas con *lis/lin/GO*, o con etopósido o trióxido de arsénico, compuestos que se sabe que activan otros mecanismos para matar a la célula.

En base a estos resultados tan sorprendentes y para entender por qué la terapia *lis/lin/GO* muestra un efecto antitumoral tan eficiente, evaluamos en profundidad los dos tipos de muerte con características distintas asociadas al sistema *lis/lin/GO* en estas líneas celulares humanas. Para ello, en primer lugar, analizamos el estado de las mitocondrias en ambas células estudiando el potencial de membrana mitocondrial. Como se observa en la [Figura 15A](#), en células U-87 MG/*lis* hay una alta proporción de células que pierden el potencial de membrana mitocondrial, esta pérdida es comparable a la obtenida con estímulos que activan caspasas como lo es el etopósido, un inhibidor

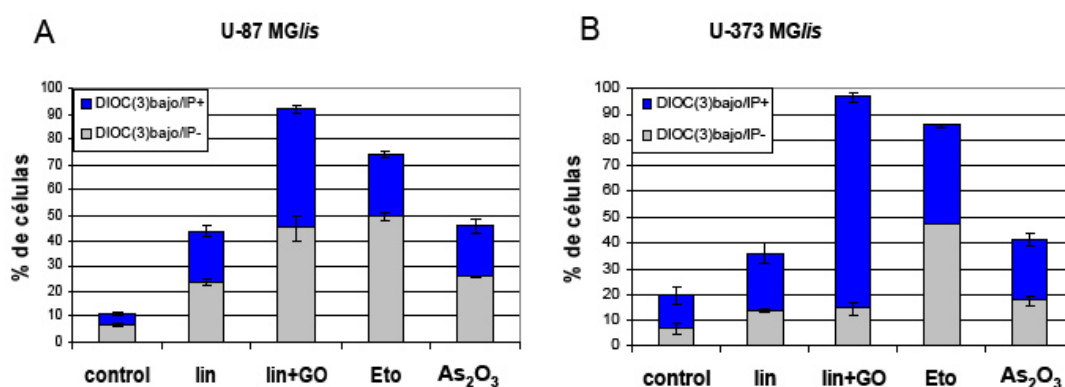


Figura 15: Estudio de la pérdida de potencial mitocondrial. Porcentaje de células (A) U-87 MG/*lis* o (B) U-373 MG/*lis* que sufren pérdida de potencial mitocondrial presentando un nivel bajo de la sonda DIOC₆(3), manteniendo o perdiendo la integridad de la membrana plasmática, lo que se muestra en un marcaje negativo o positivo, respectivamente, con yoduro de propidio (IP). Las células fueron tratadas con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml), la combinación de ambos, etopósido (Eto, 50 μ M) o trióxido arsénico (As₂O₃, 6 μ M) durante 72 h. Los valores son medias y desviaciones estándar de 3 muestras independientes.

de la topoisomerasa, que genera daño al DNA (Capranico y Binaschi 1998; Montecucco y Biamonti 2007). De manera similar, un inductor de muerte en glioblastomas, el trióxido de arsénico (Kanzawa et al. 2005), también genera un perfil similar con un porcentaje alto de células muertas que han perdido el potencial de membrana mitocondrial. Por lo contrario, el tratamiento de las células U-373 MG/*lis* con los mismos compuestos (Figura 15B), presenta una diferencia sustancial respecto a lo descrito para U-87 MG/*lis*. En el caso de *lis*/lin o *lis*/lin/GO, aunque la cantidad de células muertas (que pierden el potencial mitocondrial) es similar al de las células U-87 MG/*lis*, la mayoría de estas células pierden la integridad de la membrana plasmática. A pesar que estas células no tiene impedida la capacidad de inducir muerte manteniendo la integridad de membrana plasmática, ya que, en el caso del etopósido, hay una pérdida de potencial mitocondrial importante con mantenimiento de la membrana ($\text{DIOC}_6(3)^+/\text{IP}^-$). Por todo esto, podría asumirse que las células U-87 MG/*lis* mueren con daño mitocondrial y manteniendo la integridad de membrana plasmática y las U-373 MG/*lis* la pierden.

Estas diferencias entre la muerte de unas células y otras es un punto clave de este sistema ya que es un reflejo del papel que cumple la mitocondria en la muerte celular. Así, nuestro siguiente paso fue analizar si las proteínas mitocondriales estaban modificadas, ya que son la piedra angular de la regulación de los tipos de muerte celular (Cory y Adams 2002). Como se observa en la Figura 16 A, el tratamiento combinado en las células U-87 MG/*lis* provoca la pérdida de la tinción de citocromo c, por el contrario, en las células U-373 MG/*lis* (Figura 16 B), el citocromo c se mantiene en la mitocondria. En ambos casos las células sin tratar poseen un patrón filamentosos característico de la red mitocondrial para la tinción de citocromo c. El resultado de este análisis da ha entender que, en el caso de U-87 MG/*lis*, que presentan disfunción mitocondrial, las células pierden tinción de citocromo c, y, como se ha comentado en la introducción, esto podría ser un primer paso en la inducción de la cascada de activación de caspasas. Para continuar el análisis de ejecución de muerte dependiente de mitocondrias, evaluamos la activación de Bax, proceso en el cual Bax activo, en su forma oligomerizada, se transloca del citosol a la mitocondria para permitir la liberación de citocromo c. Así, en la Figura 16C, las células U-87 MG/*lis* muestran que Bax se transloca a la mitocondria, lo que no ocurre en el caso de las células U-373 MG/*lis* (Figura 16D). Más llamativo es que la translocación de Bax observada en las células U-87 MG/*lis* puede ser bloqueada por bafilomicina A1, un inhibidor de la ATPasa vacuolar de los lisosomas (Figura 16E), mostrando que la activación Bax es dependiente de la función lisosomal. Estos resultados en conjunto demuestran que el sistema de muerte propuesto aquí presenta características morfológicas y funcionales tanto de necrosis como de apoptosis,, aunque ninguno de estos aspectos sustenta un mecanismo de

ejecución de muerte.

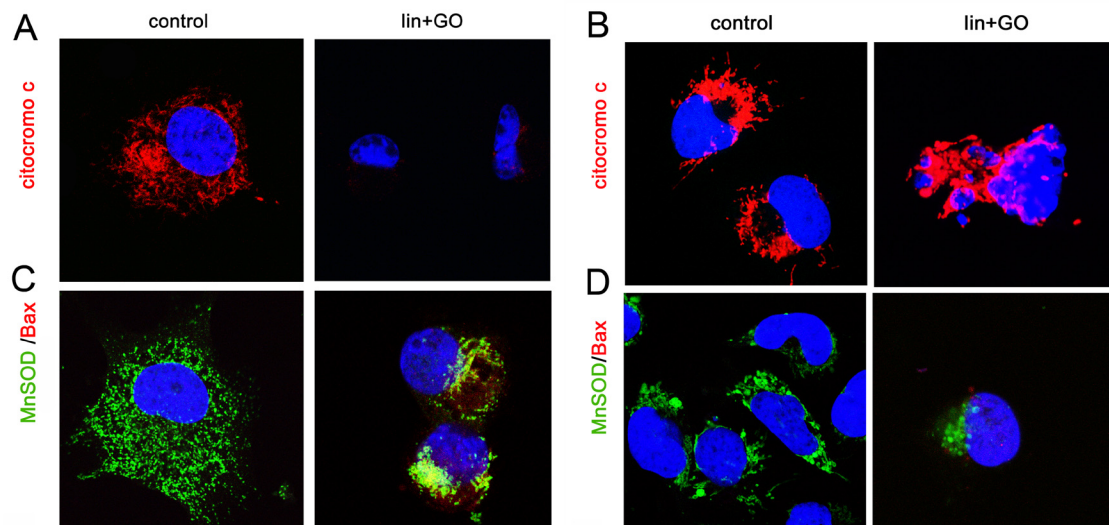


Figura 16: Fenómenos mitocondriales diferenciales en los glioblastomas humanos. Imágenes representativas de microscopia confocal en las que se muestra citocromo c (color rojo), MnSOD (color verde) y Bax (color rojo) en las células (A) U-87 MG/*lis* y (B) U-373 MG/*lis* sin tratar o tratadas con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml), en ausencia o presencia de bafilomicina (100 nM) durante 48 h.

Análisis de los mecanismos moleculares en la muerte celular inducida por daño mitocondrial en combinación con estrés oxidativo

En base a la posible participación de los lisosomas en la muerte inducida por el sistema *lis/lin/GO* en células U-87 MG, estudiamos la participación de la proteína Hsp70 (Hsp72 o Hsp70 inducible). Esta proteína se induce en múltiples situaciones de estrés y que ha sido implicada de forma directa en la muerte celular dependiente de la ruptura de los lisosomas (Nylandsted et al. 2004). El proceso de ruptura de la membrana de los lisosomas se ha denominado LMP (del inglés *lysosomal membrane permeabilization*) (Boya y Kroemer 2008) y parece estar controlado por la acción de la Hsp70 que se asocia a la membrana lisosomal protegiéndola de su ruptura, lo que impide que se liberen proteasas como las catepsinas (Nylandsted et al. 2004; Kroemer y Jaattela 2005) que están involucradas en varios tipos de muerte celular. Como puede observarse en la [Figura 17](#), el sistema combinado *lis/lin/GO* induce la expresión de Hsp70 en células U-87 MG/*lis* aunque es mucho más pronunciado en las células U-373 MG/*lis*.

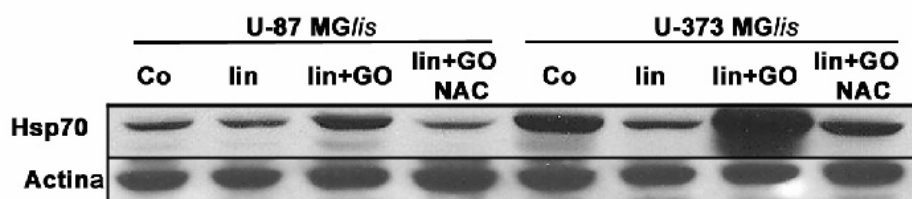


Figura 17: Estudio de la expresión diferencial de Hsp 70 en distintos glioblastomas humanos. Inmunodetección de los niveles de Hsp70 respecto a actina en las células U-87 MG/is y U-373 MG/is tratadas con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml) y N-acetil cisteína (NAC, 10 mM) según se indica, durante 36 h.

Se conoce que la Hsp70 tiene un efecto importante en la regulación de la muerte apoptótica, inhibiendo múltiples pasos de la activación de caspasas. Esta afirmación se basa en resultados en los que la expresión exógena de Hsp70 o por su inducción mediada por choque térmico inhibe la activación de las quinasas de estrés, como las quinasas de Jun (Yaglom et al. 1999; Park et al. 2001), la translocación de Bax (Stankiewicz et al. 2005) o la activación directa de caspasas por inhibición de la formación del apoptosoma (Beere et al. 2000; Saleh et al. 2000). También se ha descrito que la Hsp70 inhibe incluso la translocación de AIF en determinados procesos de muerte (Ravagnan et al. 2001).

En base a la extensa participación de las chaperonas en el bloqueo la muerte celular (Arya et al. 2007), la primera hipótesis que decidimos evaluar es si la sobre-expresión de la Hsp70 humana (utilizando el plásmido pCDNA3-Hsp70), podía proteger de la inducción de muerte en nuestro modelo de muerte celular. La sobre-expresión de Hsp70 en células U-87 MG (Figura 18A) tiene un efecto protector en la muerte que, además, se ve favorecido por la combinación de bafilomicina A1, el inhibidor de la función lisosomal, que podría estar inhibiendo la lisis lisosomal, con un efecto sinérgico. Un efecto similar puede observarse con etopósido que, a pesar de ser un inductor de daño al DNA, podría también permeabilizar los lisosomas mediante estrés oxidativo o a través de p53 (Boya y Kroemer 2008). Por otro lado, el efecto que genera la sobre-expresión de Hsp70 en las células U-373 MG (Figura 18B) es el contrario al que ocurre para las U-87 MG. En este caso, Hsp70 acelera la muerte inducida por el sistema combinado y, además, este efecto es anterior a la protección que genera bafilomicina A1.

En base a las observaciones anteriores, se podría especular que en las células U-87 MG la muerte celular inducida por el sistema combinado o el etopósido podía ser dependiente de la lisis de lisosomas. Más difícil de interpretar es el efecto que genera la sobre-expresión de Hsp70 en las células U-373 MG.

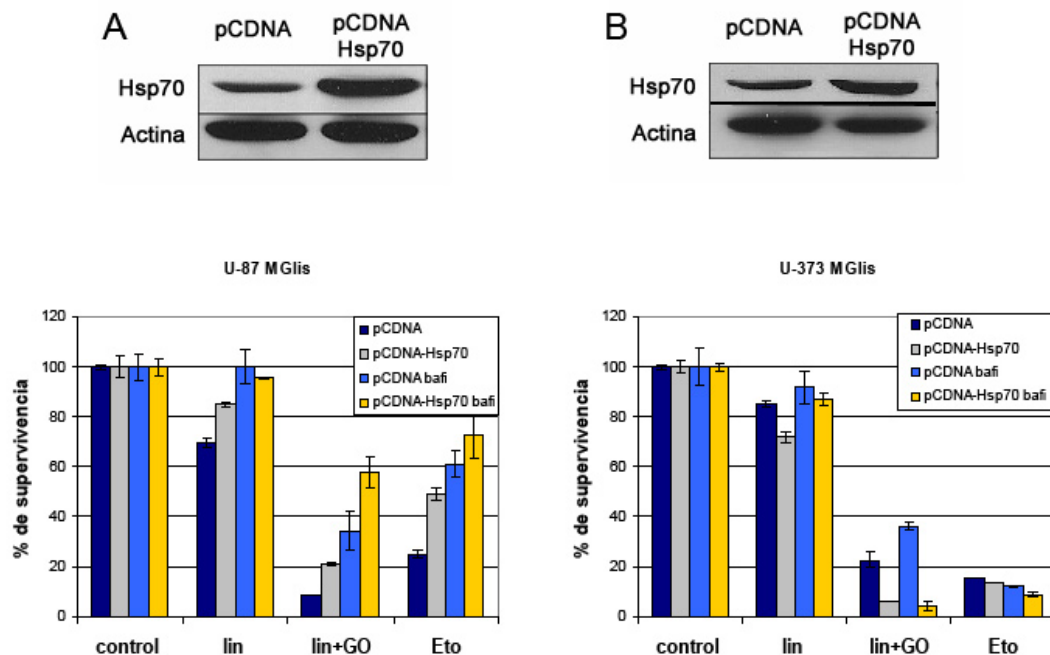


Figura 18: Efecto de la sobre-expresión de Hsp70 en la muerte. Inmunodetección de la expresión de Hsp70 en las células (A) U-87 MG *gli*s y (B) U-373 MG *gli*s transfectadas con un vector control (pCDNA) o el mismo vector que codifica la Hsp70 humana (pCNA Hsp70). También se muestra el porcentaje de supervivencia medido por MTT de estas células a las 48 h de ser tratadas con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml) y etopósido (Eto, 50 μ M) según se indica, en ausencia o en presencia de bafilomicina (bafi, 100 nM). Las gráficas muestran las medias y las desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

La interpretación de que la chaperona Hsp70 puede ser la responsable directa de un efecto de inducción de muerte en determinado contexto, se ve reforzada con el hecho de que la inhibición del 74% de su expresión utilizando RNA de interferencia genera que las células U-373 MG sean mucho más resistentes a la mayoría de los compuestos citotóxicos (Figura 19A y B).

Seguidamente evaluamos el estado de los lisosomas. Para esto realizamos una técnica utilizada comúnmente que permite la visualización de la lisis lisosomal por pérdida del patrón punteado de proteasas lisosomales que son las principales moléculas efectoras en la muerte dependiente de los lisosomas (Boya et al. 2003; Nylandsted et al. 2004). Mediante inmunofluorescencia de la cathepsina D observamos que el patrón de tinción permanece punteado tras el tratamiento con linamarina y glucosa oxidasa en células U-87 MG *gli*s (Figura 20A-B) y en U-373 MG *gli*s (Figura 20 C-D), por lo que los lisosomas permanecerían intactos, en la inducción de muerte, en ambos modelos celulares.

Además, para descartar la implicación de la lisis lisosomal en la muerte mediada

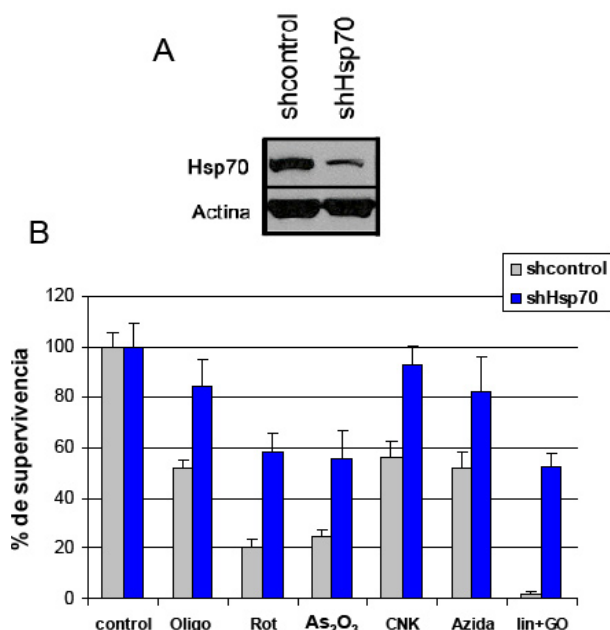


Figura 19: Análisis de la participación de la Hsp70 por inhibición de su expresión, en la muerte inducida por múltiples compuestos citotóxicos.

(A) inmunodetección de la inhibición mediada por lentivirus codificando RNA de interferencia específicos contra *hsp70*, tras 48 h de transducción y selección con 2 µg/ml de puromicina. (B) Análisis de la supervivencia por MTT a compuestos citotóxicos en células U-373 MG/lis a 72 h, habiéndose inhibido la expresión de Hsp70 con RNA de interferencia. Los compuestos utilizados fueron: Oligo (oligomicina 8 µg/ml), Rot (rotenona, 5 µM), As₂O₃ (trítóxido de arsénico, 8 µM), CNK (cianuro de potasio, 1,2 mM), Azida (azida sodica, 5 mM) y lin+GO (0,5 mg/ml linamarina y 5 mUE de glucosa oxidasa)

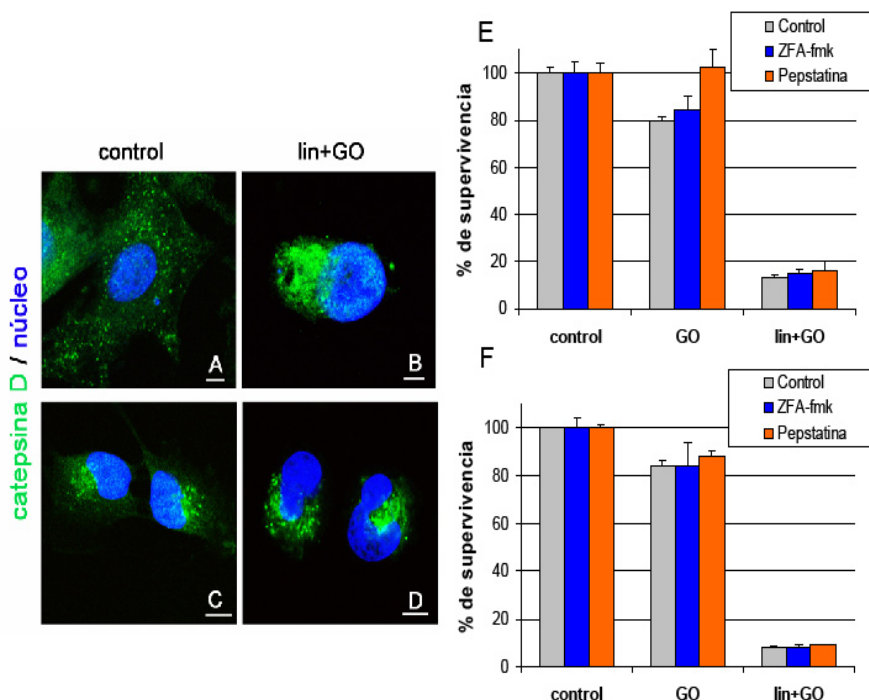


Figura 20: Estudio de la implicación de las catepsinas en la muerte. (A-D) Imágenes representativas de microscopía confocal del patrón de la catepsina D (verde) respecto a los núcleos teñidos con DAPI (azul) en células U-87 MG/lis (A y B) y U-373 MG/lis (C y D) sin tratar (A y C) o tratadas con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml) (B y D). Barras de calibración de 5 µm. (E-F) También se muestra el porcentaje de supervivencia de células U-87 MG/lis (E) y U-373 MG/lis (F) medido por MTT tratadas como se indicó en el apartado anterior y en presencia de ZFA-fmk (50 µM) y pepstatina (50 µM). Las gráficas muestran los valores medios y desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

por el sistema *lis/lin/GO*, evaluamos la participación de la actividad de las catepsinas utilizando inhibidores específicos. Utilizamos los inhibidores peptídicos permeables, ZFA-fmk y pepstatina A, que actúan irreversiblemente sobre las catepsinas B/L y catepsina D, respectivamente. Para bloquear su función, las células se incubaron con estos inhibidores a una concentración de 50 μ M durante el tratamiento con *lin/GO* y como se muestra en la [Figura 20E y F](#), ambos son incapaces de bloquear la muerte.

Por otro lado, para evaluar más a fondo la participación de la Hsp70 en la inducción de muerte mediada por daño mitocondrial y estrés oxidativo, utilizamos fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en *hsp70*. En este caso, a diferencia de los experimentos anteriores de inducción de muerte, utilizamos cianuro de potasio para generar un efecto similar al del sistema *lis/lin* y glucosa oxidasa para generar estrés oxidativo. Como se muestra en la [Figura 21A](#), en células deficientes en *hsp70* la inducción de muerte se ve impedida por la falta del gen y estas células son más resistentes a la muerte inducida por cianuro de potasio a 1,2 mM ([Figura 21B](#)), generando un importante retraso en la muerte. Un resultado similar puede obtenerse al cultivar estas células con cianuro de potasio 0,4 mM en combinación con glucosa oxidasa ([Figura 21C](#)), aunque, en este caso, el retraso de la muerte es más relevante

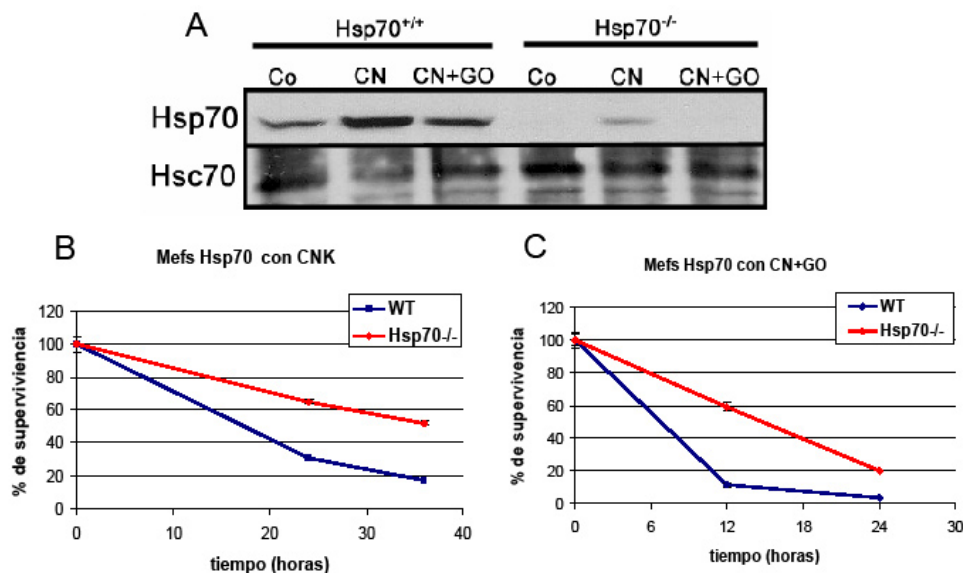


Figura 21: Implicación de la Hsp70 en la supervivencia frente cianuro y glucosa oxidasa. (A) Inmunodetección de la expresión de Hsp70 y Hsc70 en los MEF de genotipo salvaje (Hsp70^{+/+}) frente a los MEF deficientes en Hsp70 (Hsp70^{-/-}) tratados con cianuro potásico (1,2 mM) sólo o cianuro potásico (0,4 mM) en combinación con 5 mUE/ml de GO a las 24 h. (B) Estudio de la supervivencia a lo largo del tiempo medida por MTT de las mismas células tratados con cianuro potásico sólo o (C) cianuro potásico en combinación con GO, como se detalló para (A). Se muestra la media y las desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

sobre las 12 h y a las 24 h estas diferencias se acortan. Para demostrar que la inhibición de la expresión de la Hsp70 tiene la capacidad de bloquear la muerte y que el efecto que observamos no es debido a que se afecta el crecimiento celular (Daugaard et al. 2005; Rohde et al. 2005), analizamos el perfil de anexina V/yoduro de propidio en las condiciones anteriores. La **Figura 22A** muestra que la deficiencia en el gen de la *hsp70* genera una resistencia a la muerte inducida por cianuro 1,2 mM, reduciendo tanto la externalización de fosfatidilserina como la ruptura de la membrana plasmática. El efecto de protección también puede extrapolarse a las células que pierden potencial de membrana mitocondrial (**Figura 22B**). Un perfil similar de supervivencia se observa para la combinación de cianuro con glucosa oxidasa, donde la falta de *hsp70* genera una protección de la muerte a tiempos cortos (**Figura 22C y D**).

El conjunto de estos resultados evidencian una nueva visión de la función de la chaperona Hsp70 donde esta proteína tiene un efecto pro-supervivencia en un tipo celular determinado, mientras que en otros tipos de células, como los que aquí se han

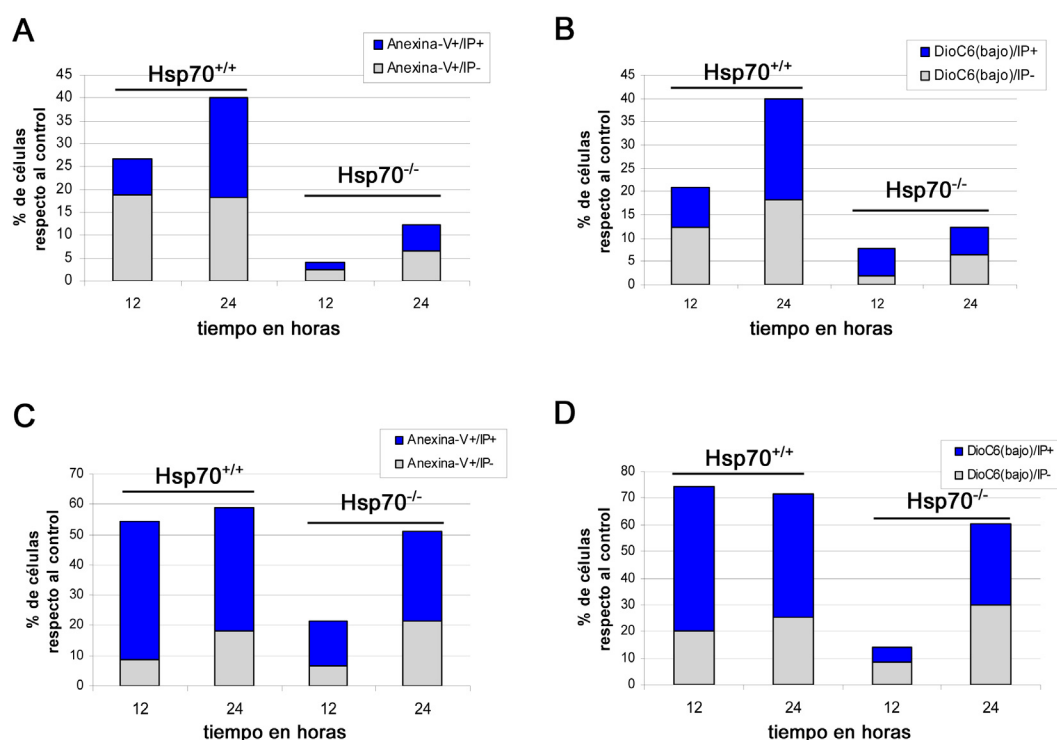


Figura 22: Estudio de la implicación de Hsp70 en la muerte por cianuro y glucosa oxidasa. (A y B) Estudio comparativo de los MEF de genotipo salvaje (Hsp70^{+/+}) o (C y D) deficientes en Hsp70 (Hsp70^{-/-}) a las 12 y 24 h del tratamiento sólo con cianuro potásico (1,2 mM) o con cianuro potásico (0,4 mM) combinado con glucosa oxidasa (5 mUE/ml). (A y C) Se representa el porcentaje de células que presentan externalización de la fosfatidilserina (tinción positiva para anexina V) o (B y D) pérdida del potencial de membrana mitocondrial (bajo marcaje de la sonda DIOC₆(3), ya sean positivas (azul) o negativas (gris) para yoduro de propidio.

analizado podría ser un ejecutor de muerte o al menos participar en la generación de alguna de las características de la muerte.

La combinación de cianuro con peróxido de hidrógeno mata a las células tumorales U-87 MG dañando las mitocondrias sin activar la caspasas y sin participación de AIF

Uno de los aspectos fundamentales de la terapia *lis/lin/GO* es la eficiencia en generación de muerte y una gran capacidad antitumoral en el modelo de xenotransplante de U-87 MG. Por esta razón se focalizó el estudio en las células del glioblastoma U-87 MG. Habiendo observado un daño considerable sobre las mitocondrias, evaluamos

seguidamente las proteínas mitocondriales involucradas en la ejecución de la muerte de la célula, tales como citocromo c y AIF (del inglés *apoptosis inducing factor*). La translocación de AIF desde el espacio intermembrana mitocondrial al núcleo es un proceso relevante para determinados tipos de muerte dependiente de estrés oxidativo (Cregan et al. 2004). Por esta razón evaluamos el estado de las proteínas mitocondriales cuando las células U-87 MG/*lis* se tratan con 0,5 mg/ml de lin en combinación con GO. Como puede

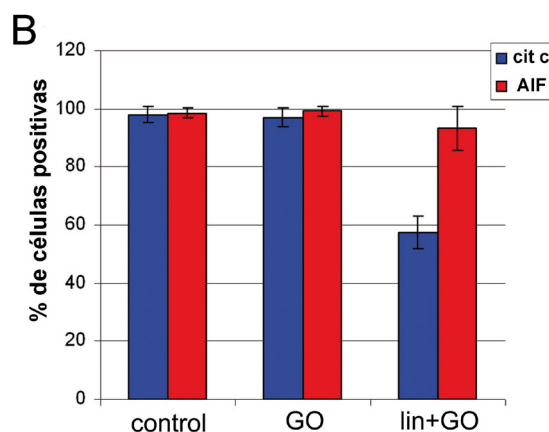
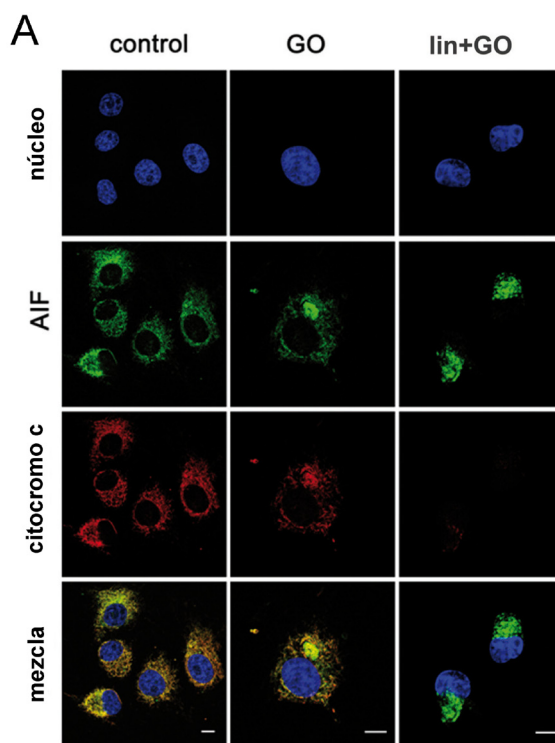


Figura 23: Estudio de la translocación de citocromo c y AIF. (A) Imágenes de microscopía confocal representativas de la expresión de AIF (verde) y citocromo c (rojo) en células U-87 MG/*lis* tratadas durante 48 h con GO (5 mUE/ml) y lin (0,5 mg/ml). Barra de calibración de 10 μ m. (B) Cuantificación del porcentaje de células que presentan tinción positiva para cada proteína respecto al número de núcleos teñidos con DAPI. Se muestran medias y desviaciones estándar de los datos obtenidos contando 5 campos (20X) al azar.

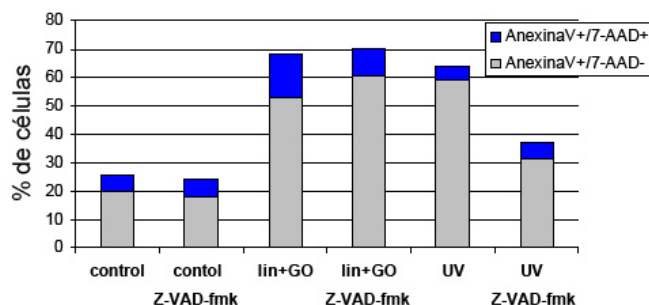


Figura 24: Participación de las caspasas en la muerte del sistema *lis/lin/GO*. Porcentaje de células U-87 MG/*lis* que presentan translocación de fosfatidilserina (tinción positiva para anexina V) con permeabilización de la membrana plasmática (7-AAD⁺) o manteniéndola intacta (7-AAD⁻) cuantificado por citometría de flujo a las 54 h del tratamiento con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml), o a las 24 h de irradiación ultravioleta (UV, 16,7 J/m²) y en presencia de zVAD-fmk (100 μ M)

observarse en la [Figura 23A](#), la tinción de citocromo c se pierde de la mitocondria con lin/GO, mientras que la tinción de AIF permanece con un patrón mitocondrial. La cuantificación de la tinción muestra que un alto porcentaje, alrededor de un 40% de las células, pierden el citocromo c ([Figura 23B](#)). Este hecho nos hizo especular que un posible mecanismo de ejecución de muerte en las células U-87 MG podría ser un mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas. Para evaluar la participación de dicho mecanismo utilizamos el inhibidor de pan-caspasas, Z-VAD-fmk, a alta concentración (100 μ M). En esta condición no se consiguió inhibir la muerte ([Figura 24](#)) en presencia de lin/GO ya que la muerte con perfil apoptótico pasa de un 52,9% a un 60,3% en las condiciones control y en presencia de Z-VAD-fmk, respectivamente. En

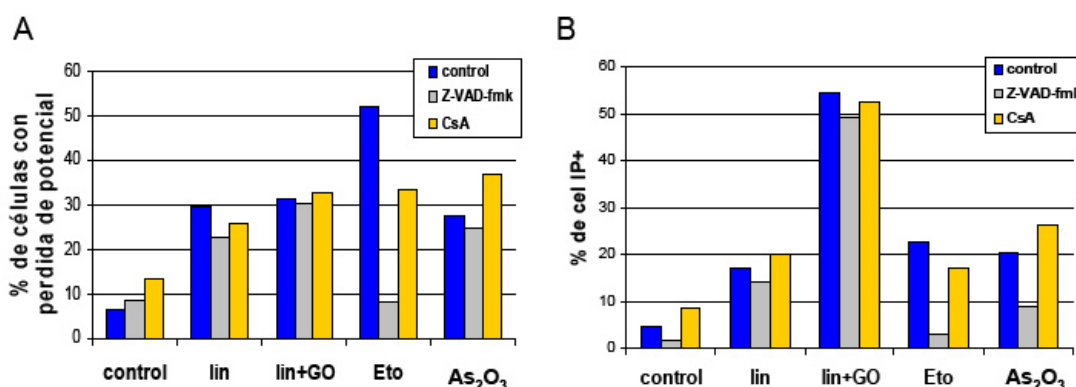


Figura 25: Independencia de caspasas y de la permeabilización mitocondrial. (A) Porcentaje de células U-87 MG/*lis* que pierden el potencial mitocondrial presentando un bajo marcaje para la sonda DIOC₆(3) tras un tratamiento de 72 h con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml), etopósido (Eto, 50 μ M) y trióxido arsénico (As₂O₃, 6 μ M) y en presencia de Z-VAD-fmk (100 μ M) y ciclosporina (CsA, 1 μ M). (B) Porcentaje de células que pierden la integridad de membrana reflejada en una tinción positiva para yoduro de propidio en las mismas condiciones.

cambio el tratamiento control de ultravioleta (UV) es rescatado eficientemente por este inhibidor a la misma concentración de 100 μ M. Este resultado fue reafirmado analizando las células que perdían potencial de membrana (Figura 25A), donde se observó que sólo podía revertirse el daño mitocondrial en el caso del etopósido. Para el caso lin/GO, ni las mitocondrias ni la permeabilización de la membrana plasmática (Figura 25B) eran modificadas en presencia del inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-fmk. Por otro lado, se utilizó la ciclosporina A como inhibidor del poro de transición de membrana mitocondrial para evaluar la participación de la formación del poro de transición de permeabilidad, ya que esta molécula inhibe la ciclofilina D, uno de sus componentes fundamentales (Figura 25A y B). En presencia de ciclosporina A se observó el mismo patrón que con Z-VAD-fmk, aunque la protección de la muerte por etopósido fue más modesta, debido a que sólo genera un efecto de bloqueo parcial cuando el poro de transición es regulado por Bax/Bak (Scorrano et al. 2003).

Aunque habíamos observado que AIF presentaba un patrón mitocondrial tras el

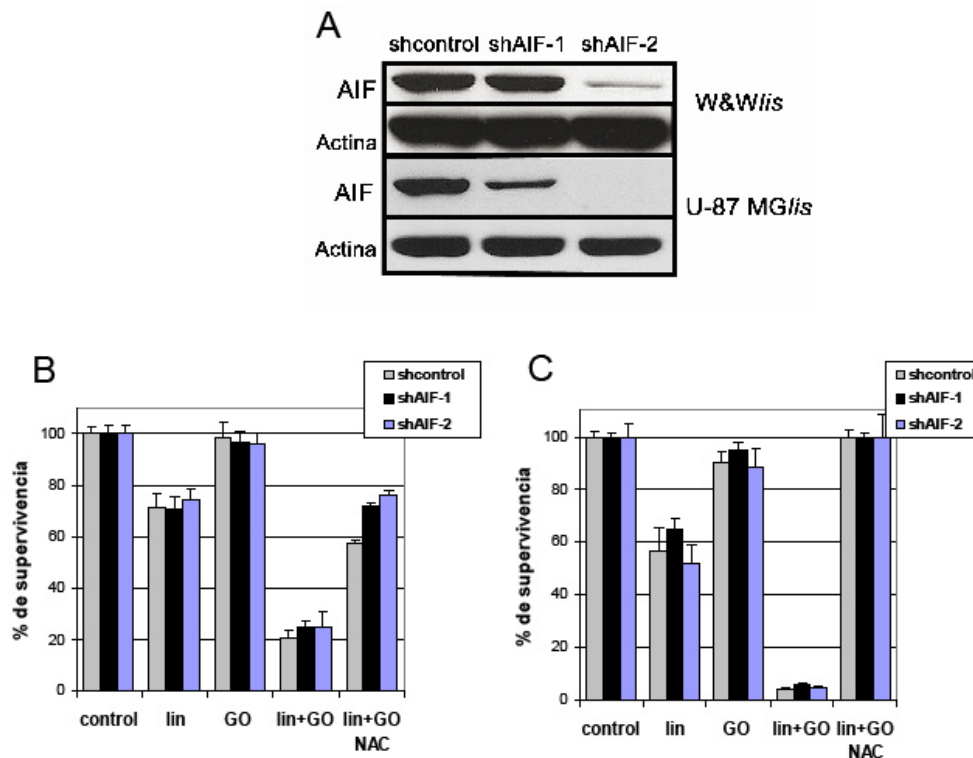


Figura 26: Independencia de AIF en la muerte. (A) Inmunodetección de los niveles proteicos de AIF en las células W&Wlis y U-87 MGlis transfectadas con un plásmido que codifica un RNAi control (shcontrol) o con plásmidos con RNAi contra AIF. (B) Porcentaje de supervivencia medido por MTT de W&Wlis a 36 h o (C) U-87 MGlis a 48 h transfectadas y seleccionadas establemente con 1 mg/ml de G418 como en A tras un tratamiento con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml) y N-acetilcisteína (NAC, 10 mM) según se indique. Las gráficas muestran las medias y desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

tratamiento con lin/GO, quisimos confirmar que este regulador/ejecutor de la muerte mediada por estrés oxidativo no tenía ninguna participación en la muerte analizada en este trabajo. Con esta finalidad construimos una serie de RNAs de interferencia para bloquear la función de AIF. Estos tenían la capacidad de inhibir su expresión tanto en células de glioblastoma canino W&W/*lis*, donde se observó un 81% de inhibición con el shAIF-2 (no así con el shAIF-1 que no tenía efecto inhibitorio), como en células humanas U-87 MG, en las que el shAIF-1 generaba una inhibición del 53% y el shAIF-2 una del 99,5% de la expresión total de la proteína (Figura 26A). Mediante la expresión estable de estos interferentes se analizó el papel de AIF en la muerte mediada por lin/GO, pudiéndose observar que en las células W&W/*lis* (Figura 26B) y en U-87 MG/*lis* (Figura 26C) el silenciamiento de AIF no modifica la muerte inducida por el sistema combinado, excluyendo la participación de esta proteína del mecanismo de muerte.

La generación de daño mitocondrial agudo en combinación con estrés oxidativo es un potente inductor de autofagia

Daño mitocondrial, estrés oxidativo y proteínas de estrés

Varios aspectos del daño mitocondrial analizados nos hicieron preguntarnos como estaba la estructura filamentosa de las mitocondrias cuando se sometían al estrés generado por la inhibición de la cadena de transporte de electrones y la condición adicional del incremento del estrés oxidativo, mediada por la combinación con glucosa oxidasa. Así, observamos que la estructura normal de las mitocondrias estaba gravemente afectada por el sistema *lis/lin* donde el patrón filamentoso se perdía, como lo demuestra la cuantificación de células con patrón punteado de mitocondrias (Figura 27A). El tratamiento con linamarina induce un evidente patrón punteado que corresponde a mitocondrias aisladas de la red mitocondrial (Figura 27B). En cambio, con el sistema *lis/lin* combinado con glucosa oxidasa (lin/GO) se observa que las mitocondrias, además de permanecer con un patrón punteado, pasan a tener un tamaño mayor. Este hinchamiento (denominado en inglés, *swelling*), representa cuando las mitocondrias que han perdido su potencial de membrana, por la ruptura de ambas membranas mitocondriales, la interna y la externa. La ruptura de la red mitocondrial, comúnmente denominada fisión mitocondrial, parece estar mediada por el cianuro producido por el sistema *lis/lin*. Este efecto ya había sido documentado con anterioridad para otros inhibidores de la cadena de transporte de electrones (Lyamzaev et al. 2004; Pletjushkina et al. 2006). Aunque visualmente parece un efecto perjudicial, esta fisión de la red mitocondrial puede ser rápidamente revertida en las células por un

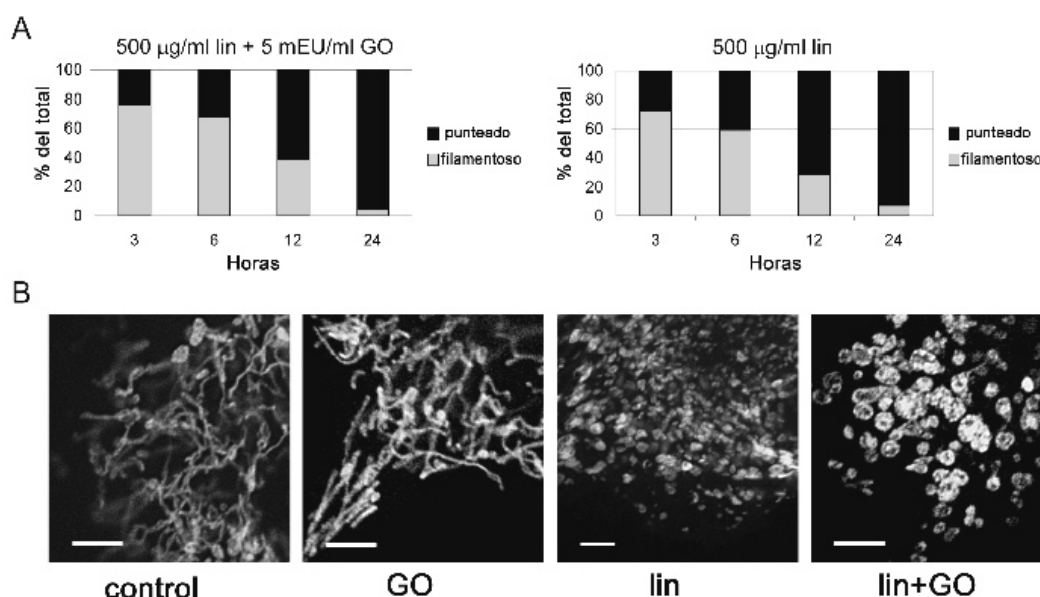


Figura 27: Estudio de la dinámica mitocondrial. (A) Porcentaje de células W&W/Is que expresan DsRed2-mito que presentan un patrón mitocondrial filamentosos o punteado tras un tratamiento con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mEU/ml) o un tratamiento sólo con lin a lo largo del tiempo. Se cuantificaron 20 campos (63X) al azar contando 200-300 células por condición. (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de las mitocondrias de estas células tras los tratamientos indicados. Barras de calibración de 5 μm .

proceso denominado fusión, recuperando la función normal de las mitocondrias (Suen et al. 2008).

Seguidamente se analizó de forma detallada la situación de estrés celular en el que se encuentran sometidas las células cuando se estimula la muerte con el sistema combinado. En primer lugar evaluamos si el inhibidor del estrés oxidativo, Tiron, era capaz de revertir la muerte, y efectivamente como se observa en la [Figura 28A](#), es capaz de bloquear un importante porcentaje de la muerte inducida por el sistema *lis/lin/GO*.

Para corroborar que tras distintos estímulos de muerte se generaba estrés oxidativo mitocondrial utilizamos la sonda hidroxietidio para determinar la cantidad de peróxido de hidrógeno intracelular que se estaba generando. De esta forma, pudimos verificar que tanto en sistema *lis/lin*, GO o *lis/lin/GO*, inducían estrés oxidativo ([Figura 28B](#)). Adicionalmente, pudimos comprobar que cada sistema por separado produce una cantidad media de peróxido de hidrógeno intracelular y el sistema combinado es el que produce la mayor cantidad en un efecto sinérgico. Además mediante la adición de N-acetilcisteína que posee acción antioxidante pudimos verificar que este estrés oxidativo se inhibía ([Figura 28B](#)).

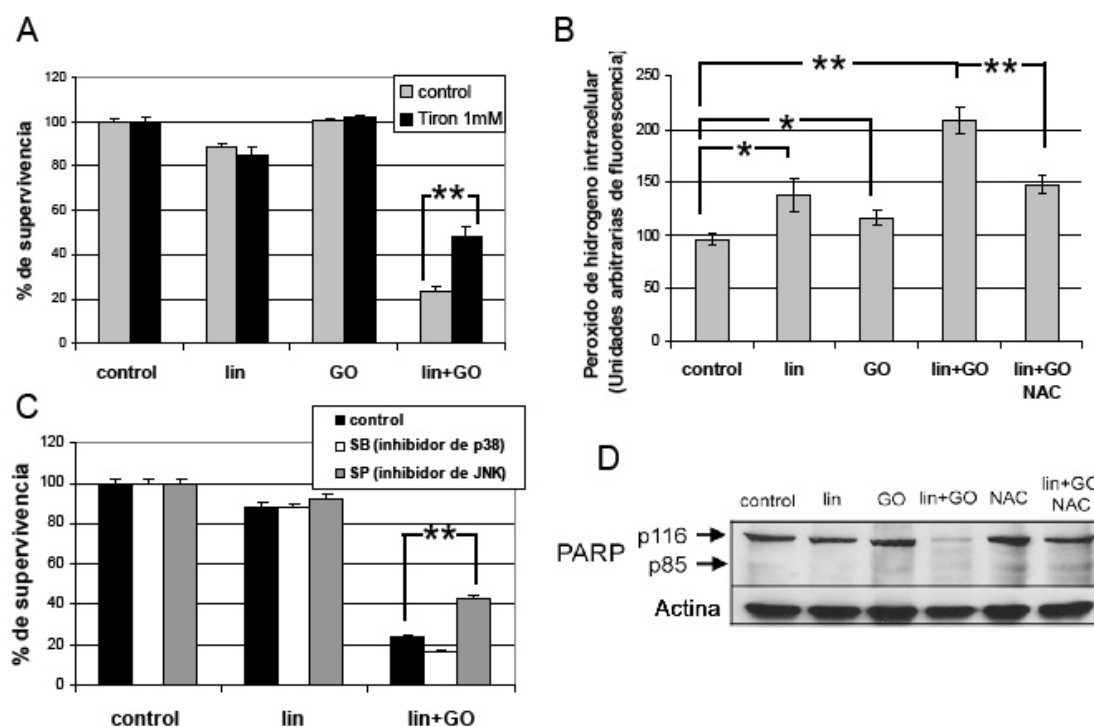


Figura 28: Papel del estrés oxidativo, quinasas de estrés y PARP en el sistema *lls/lin/GO*. (A) Porcentaje de supervivencia medida por MTT de las células W&W/*lls* tratadas durante 30 h lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mEU/ml) y en presencia de Tirón (1 mM). (B) Medida de la cantidad de especies reactivas de oxígeno, fundamentalmente H_2O_2 intracelular, en las células W&W/*lls* tratadas durante 36 h con lin, GO y NAC (10 mM) utilizando la sonda dihidroxietidio (4 μ M). (C) Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las células W&W/*lls* tratadas durante 30 h como en A, y en presencia de un inhibidor de p38 (SB203580, 30 μ M) o un inhibidor de las quinasas NH_2 -terminal de c-Jun (JNK) (SP600125, 10 μ M). Se muestran las medias y desviaciones estándar de 3 muestras independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. (D) Estudio del estatus de PARP en células W&W/*lls* a las 40 h del tratamiento como en B.

En base a que la mayoría de las situaciones de estrés celular suelen estar coordinadas por las quinasas de estrés, quisimos evaluar su posible implicación en nuestro sistema. Para esto analizamos si la muerte celular era sensible a inhibidores específicos de estas quinasas, como el inhibidor de la quinasa de p38 (SB203580) y el de las quinasas de Jun (SP600125). Pudimos observar que sólo el inhibidor de las quinasas de Jun permitía un rescate de la muerte inducida por el sistema *lls/lin/GO* (Figura 28C).

Otra proteína que suele estar involucrada en situaciones de estrés que conducen a la muerte de la célula es PARP1. Esta proteína se inactiva a consecuencia de la activación de caspasas, pero, si éstas no se activan durante la muerte, PARP media la unión de ADP-ribosa a múltiples sustratos, controlando su función. Por ejemplo, cuando en la células se produce daño al DNA excesivo, PARP1 provoca el reclutamiento de proteínas de reparación del daño (Althaus et al. 1999; Pleschke et al. 2000).

Recientemente, también se ha demostrado que esta proteína cumple un papel muy importante en la señalización de varios tipos de muertes celulares (Heeres y Hergenrother 2007). Nosotros encontramos que la proteína PARP1 (de 116KD) desaparecía con el tratamiento de lin/GO (Figura 28D), sin que apareciera el producto de corte debido a la acción de las caspasas (85KD), lo que confirmaba que las caspasas no estaban activas. Este dato, unido al demostrado en la Figura 14B utilizando el inhibidor de PARP1, 1,5-isoquinolinediol, demuestran que esta proteína no ejerce ningún efecto en la muerte estudiada aquí.

Participación de las vacuolas autofágicas en la muerte generada por el sistema lis/lin/GO

En base a diversos antecedentes en la literatura y a la participación del estrés oxidativo en la muerte, nos preguntamos si la autofagia podría ser la responsable de la drástica muerte generada por el sistema *lis/lin/GO*. Para evaluar esta implicación utilizamos altas concentraciones de 3-metiladenina, que inhibe eficientemente la fosfatidilinositol 3-OH quinasa (PI3K) de clase III, la cual está encargada de controlar la generación de vacuolas autofágicas, que son las que median el englobamiento de partes de citoplasma que, finalmente, se confinan a su degradación. Sorprendentemente, pudimos observar que la 3-metiladenina era un potente inhibidor de la muerte por lin/GO en células de glioblastoma canino W&W/*lis* (Figura 29A). Para demostrar que el rescate de la muerte que generaba este inhibidor no era debido a un efecto inespecífico, evaluamos la capacidad inhibitoria de la 3-metiladenina en la generación de vacuolas autofágicas. Para ello, las células W&W/*lis* se transfectaron con un plásmido que codifica la proteína LC3 fusionada en el N-terminal con GFP, y analizamos por microscopía de fluorescencia la formación de vacuolas. En las células en las que se induce autofagia esta proteína de fusión GFP-LC3 pasa de estar libre en el citosol a marcar las vacuolas autofágicas, constituyendo un patrón punteado de GFP-LC3. En la Figura 29B se muestra la cuantificación de células con patrón punteado de GFP-LC3. Pudimos observar que tras el tratamiento con lin+GO hay un mayor porcentaje de células con alto contenido de vacuolas autofágicas, como se muestra en detalle en las imágenes de fluorescencia de la Figura 29C. Una identificación mucho más precisa, aunque poco cuantitativa, es el análisis por microscopía electrónica de las vacuolas autofágicas que están constituidas por vesículas de doble membrana lo que les confiere una característica inequívoca que puede ser observada en las micrografías. Así, en la Figura 29D pueden observarse estas vesículas que engloban contenido citoplasmático que en algunos casos contienen mitocondrias como se observa en el panel inferior derecho de dicha figura.

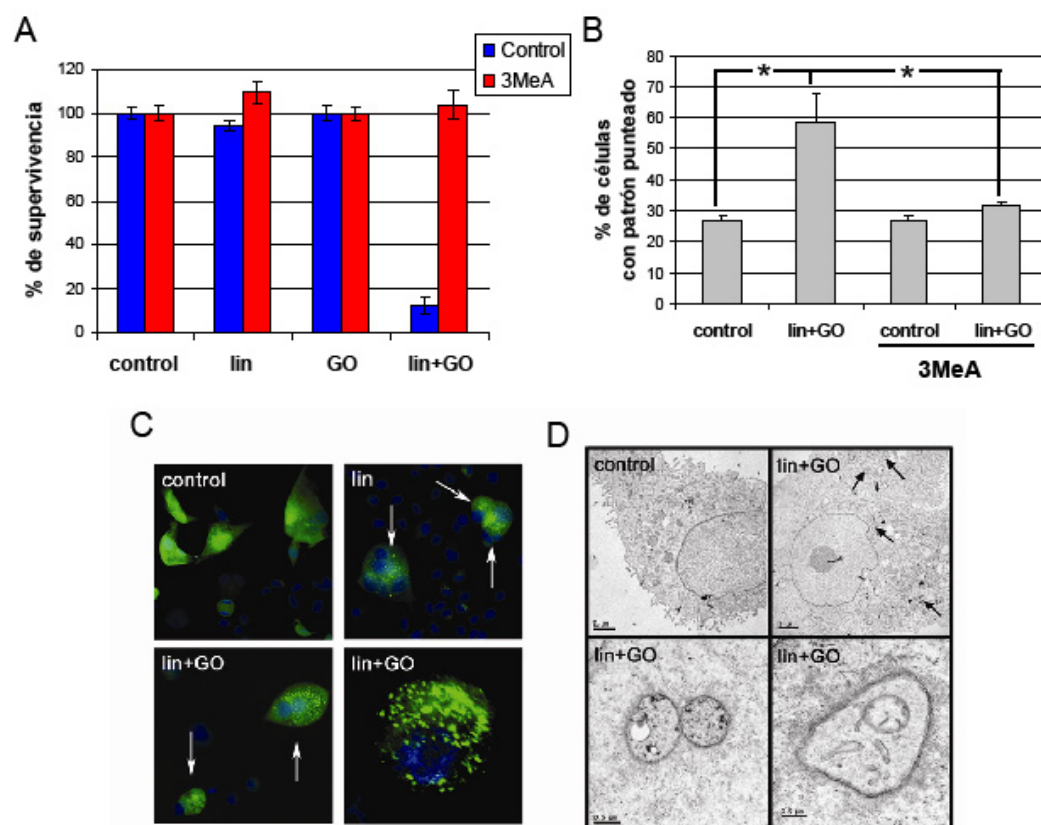


Figura 29: El sistema *lis/lin/GO* induce muerte mediada por autofagia en *W&W/lis*. (A) Porcentaje de supervivencia medido por MTT a las 48 h de la adición de lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml) y en presencia de 3-metiladenina (3MeA, 10 mM). Se muestran las medias y desviaciones estándar de 3 muestras independientes. (B) Porcentaje de estas células transfectadas con pGFP-LC3 que presentan un patrón punteado de LC3 a las 24 h del tratamiento como se detalla en A. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 3 muestras independientes en cada una de las cuales se contaron 200-300 células que expresaban GFP. *, $P < 0,05$. (C) Imágenes representativas del patrón de LC3 en las células del apartado B. Las flechas señalan células que presentan patrón punteado de LC3. El último panel muestra en detalle una de estas células. (D) Imágenes de microscopía electrónica representativas de las células tratadas como en A mostrando vesículas de doble membrana que se señalan con flechas negras, algunas de las cuales están amplificadas en los paneles inferiores. Las barras de calibración son de 2 μ m en los paneles superiores y de 0,5 μ m en los inferiores.

Aunque el análisis por microscopía electrónica es la determinación más exacta para la identificación de vacuolas autofágicas (Eskelinen 2005), la cuantificación resulta difícil y en algunos casos puede ser incorrecta debido a que la vida media de las vacuolas o su contenido es muy corto, ya que la fase degradativa puede ser más importante que la propia generación de vacuolas, lo que podría llevar a interpretaciones incorrectas. A pesar de que la mayoría de los investigadores e incluso en las revisiones de los mecanismos de muerte celular sostienen que sólo se considera inducción de autofagia cuando hay un aumento de la generación de vacuolas, en realidad, esto es sólo una

parte del proceso. Recientemente se ha publicado una serie de modelos que permiten un mejor entendimiento de cómo se debería analizar la generación de vacuolas, donde el flujo de autofagia empieza a tener mayor relevancia ya que éste representa el balance entre generación y degradación de vacuolas (Rubinsztein et al. 2009). Un ejemplo que refleja lo descrito anteriormente puede observarse en la [Figura 30](#). En primer lugar pudimos observar que, aunque la glucosa oxidasa no genera ninguna modificación en la supervivencia de las células, a las concentraciones utilizadas, su combinación con el sistema *lis/lin* hace que éste sea más eficiente en matar ([Figura 30A](#)). Si analizamos por separado los distintos componentes que constituyen el ciclo de autofagia, podemos ver que la glucosa oxidasa genera inducción de vacuolas autofágicas observada en la cuantificación de patrón punteado de LC3 al adicionar cantidades crecientes de esta enzima al cultivo ([Figura 30B](#)). Por otro lado, cuando analizamos por inmunodetección la cantidad de LC3I y LC3II, se observa que la glucosa oxidasa aumenta la cantidad de

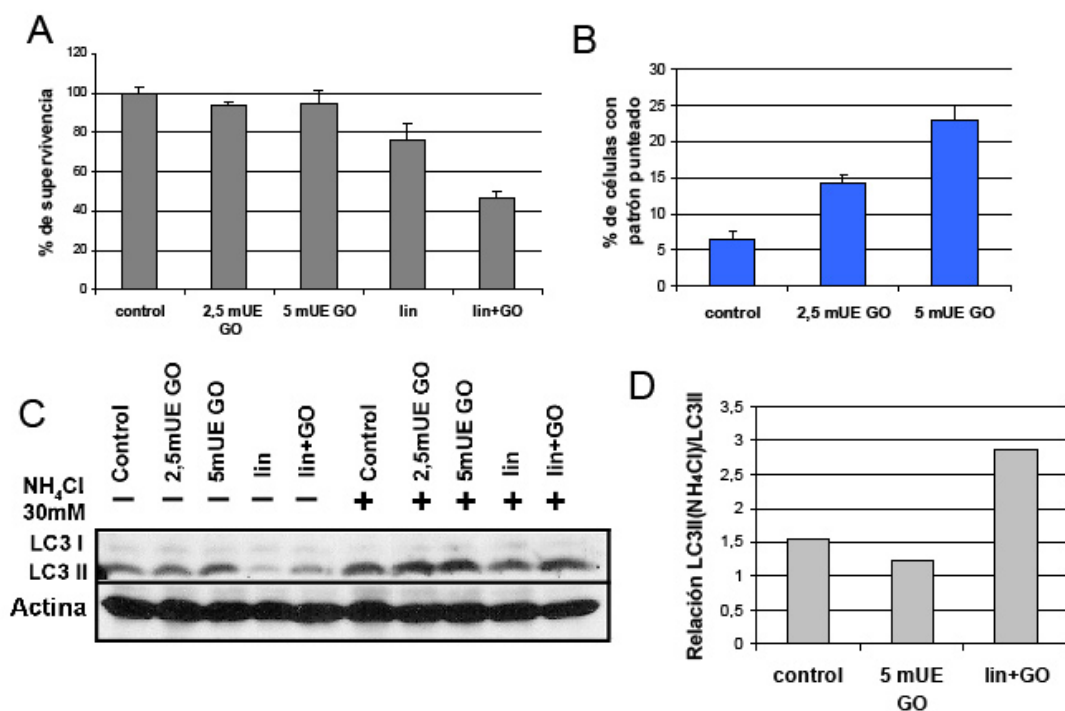


Figura 30: Regulación de la formación de autofagosomas. (A) Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las células W&W/*lis* tratadas durante 24 h con las cantidades indicadas de GO, lin (0,5 mg/ml) y la combinación de lin y GO (5 mUE/ml). La gráfica muestra los valores medios y desviaciones estándar de 3 muestras independientes. (B) Porcentaje de células W&W/*lis* transfectadas con pGFP-LC3 que presentan un patrón mitocondrial punteado respecto al total de células que expresan GFP tras un tratamiento de 24 h con las cantidades indicadas GO. Los resultados muestran las medias y desviaciones estándar de los valores obtenidos por campo contando 150-200 células GFP en total. (C) Estudio de la fragmentación de LC3 a las 12 h de tratar las células en las mismas condiciones que en A y en presencia de NH₄Cl (30 mM). (D) Cuantificación del flujo de autofagia representado en la relación de LC3 II respecto a LC3 I en presencia de NH₄Cl del experimento detallado en C.

LC3II, aunque, por el contrario, la adición de lin o lin+GO, más que aumentar la inducción de vacuolas autofágicas, produce un descenso de la cantidad de LC3II (Figura 30C). Sin embargo, cuando bloqueamos el proceso de degradación con cloruro de amonio, en el tratamiento con lin+GO, se acumula mucha más cantidad de LC3II que con glucosa oxidasa sola. Este efecto se puede observar aún más claramente representando en el cociente de la cuantificación de la banda de LC3II en situación de bloqueo de la fase degradativa (NH_4Cl) respecto a LC3II sin este bloqueo (Figura 30D).

En un resumen la Figura 31 muestra un esquema representativo del sistema donde la glucosa oxidasa estimula la generación de vacuolas autofágicas sin generar muerte, por otro lado, el sistema *lis/lin* tiene la capacidad de inducir fisión mitocondrial además de activar la fase degradativa de la autofagia (como se observó en la Figura 30C y D por el aumento de la relación LC3II/LC3I tras la adición de NH_4Cl), y, por ello, la combinación de ambos en el sistema *lis/lin/GO* acelera la muerte ya que las células generarían una autofagia más efectiva.

A continuación se analizó si la generación de vacuolas autofágicas también

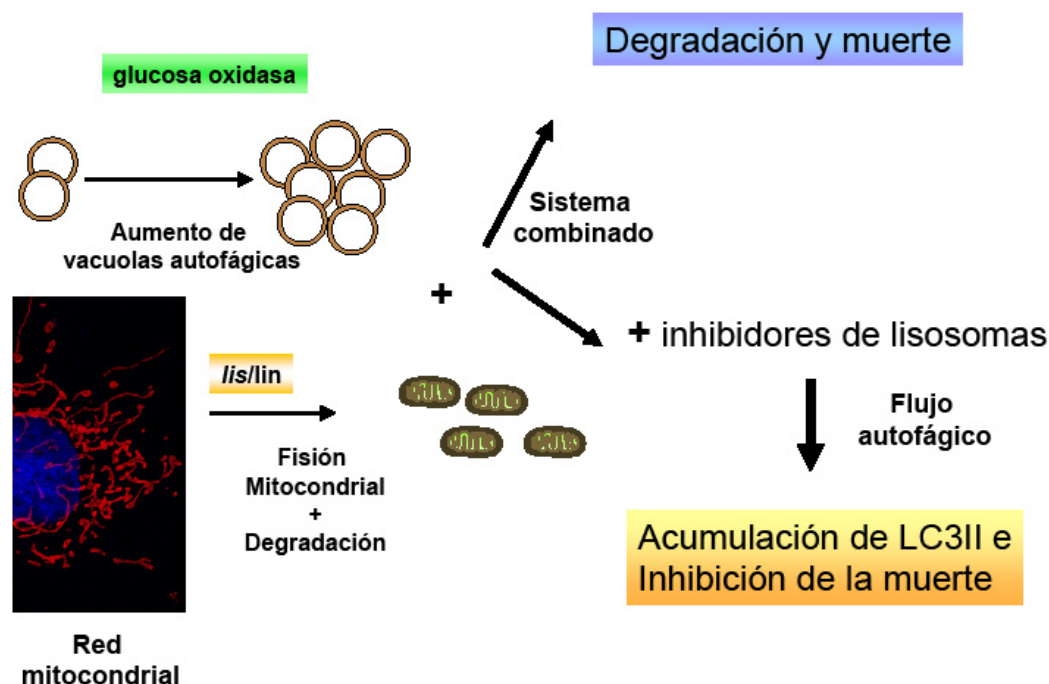


Figura 31: Esquema representativo de como se ha interpretado la generación de vacuolas autofágicas y la muerte celular del sistema combinado en base al flujo autofágico. La glucosa oxidasa favorece la muerte celular aumentando la generación de vacuolas autofágicas que combinado con el efecto de fisión mitocondrial este sistema induce una muerte rápida de las células, con una fase degradativa muy exacerbada cuando se ejecuta la muerte.

ocurría en los glioblastomas humanos. Para esto transfectamos células U-373 MG/*lis* con el plásmido que expresa GFP-LC3. Pudimos observar que, tanto en la condición de lin+GO como en presencia de As_2O_3 , se genera una vacuolización celular intermedia que, aunque es mayor que en las células control, no es comparable a la obtenida tras la inhibición de la función lisosomal con bafilomicina A1 (Figura 32A y B). Esto es debido a que la bafilomicina A1 bloquea la fusión de las vacuolas autofágicas con los lisosomas inhibiendo, por tanto, la degradación de LC3II, lo que en este caso, se ha utilizado como control positivo de vacuolización. Para evaluar si la generación de estas vacuolas contribuían en la muerte de las células expuestas al sistema combinado *lis/lin/GO*, el proceso de autofagia fue bloqueado utilizando 3-metiladenina y un RNA de interferencia específico para ATG5. Como muestra la Figura 32C y D, ambas inhibiciones tienen la

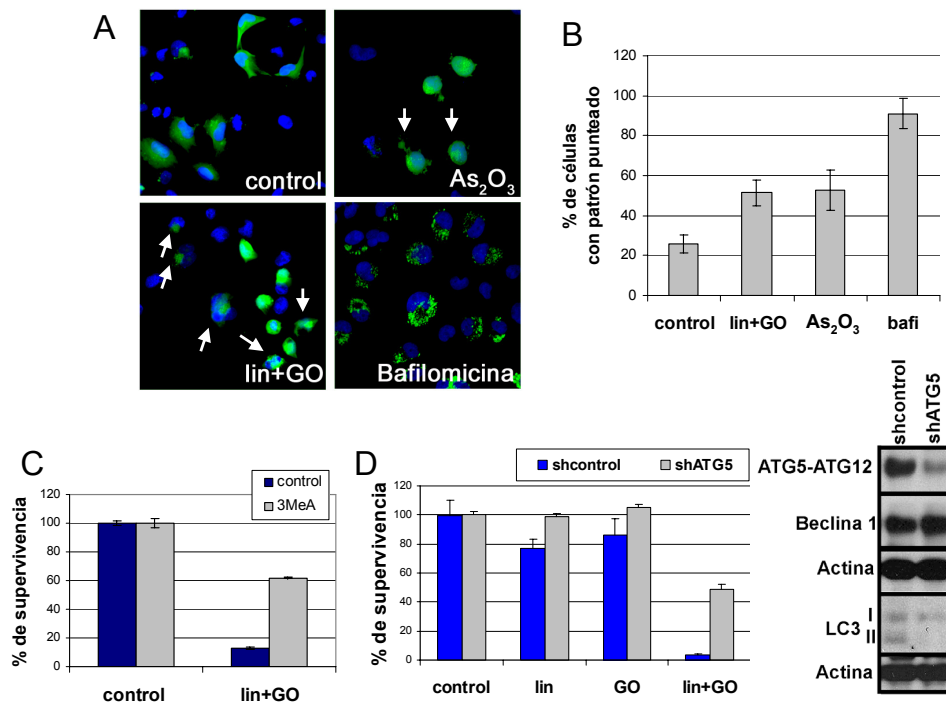


Figura 32: Estudio de la inducción de autofagia en U-373 MG/*lis*. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de las células U-373 MG/*lis* transfectadas con pGFP-LC3 tratadas durante 24 h con As_2O_3 (6 μM), lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml), y bafilomicina (100 nM) como control positivo para la formación de vacuolas. (B) Cuantificación del porcentaje de células que presentan un patrón de LC3 punteado respecto al total de células GFP. Se representan los valores medios y desviaciones estándar por campo contando 150-200 células en total. (C) Porcentaje de supervivencia cuantificada por MTT de las células U-373 MG/*lis* tratadas durante 48 h con lin y GO como en A y en la presencia de 3-metiladenina (3MeA, 10 mM). (D) Porcentaje de supervivencia de las células U-373 MG/*lis* infectadas con un lentivirus que codifica un shRNA control (shcontrol) o contra *atg5* (shATG5) tratadas durante 48 h con lin y GO en las condiciones detalladas en A. Las gráficas muestran valores medios y desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

capacidad de bloquear la muerte generada por este sistema. En conclusión, podemos decir que en las células U-373 MG el sistema *lis/lin/GO* genera un perfil de muerte con ruptura de la membrana plasmática (como se observó en el apartado anterior) en el que participa la generación de vacuolas autofágicas.

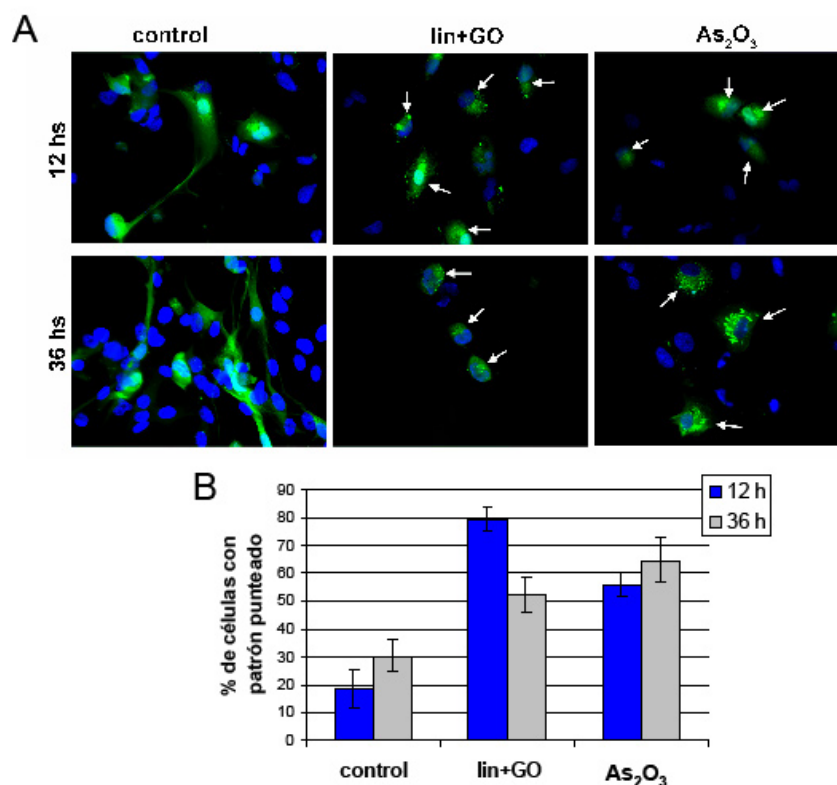


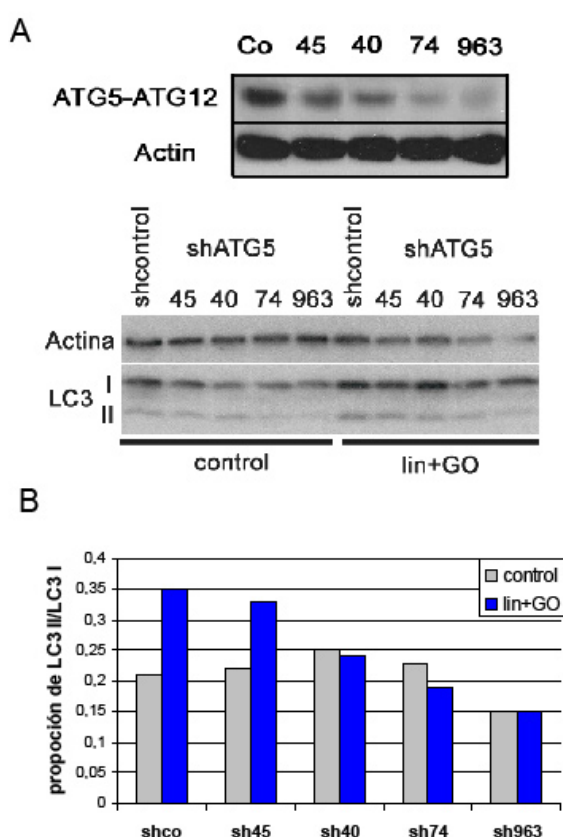
Figura 33: Estudio de la inducción de autofagia en U-87 MG/lis. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de las células U-87 MG/lis transfectadas con pGFP-LC3 tratadas durante 12 h o 36 h con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml), y As₂O₃ (6 μM). Las flechas blancas señalan células con un patrón de GFP-LC3 punteado. (B) Cuantificación del porcentaje de células que presentan un patrón de LC3 punteado respecto al total de células GFP en el experimento detallado en A. Se representan los valores medios y desviaciones estándar por campo contando 150-200 células en total.

Adicionalmente, se evaluó de forma similar la muerte en el modelo celular de glioblastoma U-87 MG. Pudimos observar que sí se inducían vacuolas al poner las células en contacto con el sistema combinado *lis/lin/GO*. En este modelo celular era más evidente la vacuolización y las células mostraban un patrón punteado más prominente tanto a 12 h como a 36 h post-tratamiento (Figura 33A) que se reflejaba en un porcentaje mayor de células con vacuolas autofágicas en la cuantificación (Figura 33B). Un detalle interesante que se puede observar en U-87 MG es que el porcentaje de células con vacuolización disminuye cuando el porcentaje de muerte aumenta, que a 36 h es aproximadamente del 40% como se mostró anteriormente (Figura 8).

Posteriormente, evaluamos la eficiencia en U-87 MG de una serie de RNA de interferencia específicos contra ATG5, analizando la capacidad que presentaban cada uno de ellos para inhibir tanto ATG5 como la formación de LC3II como marcador fundamental de vesículas autofágicas (Figura 34). Para la expresión de RNA de interferencia se utilizó el sistema basado en vectores lentivirales de la biblioteca de TRC de Sigma, y, como puede observarse en la Figura 34A, la serie de RNAs presentan una capacidad de reducir la formación de vacuolas autofágicas (LC3II) proporcional a su capacidad de reducir la expresión de ATG5. En un análisis detallado de la inducción de vacuolas representado como el cociente de LC3II/LC3I (Figura 34B), se muestra que sólo se produce una reducción de LC3II tras el tratamiento con lin+GO, cuando se genera una inhibición de ATG5-ATG12 superior al 50% (sh40, sh74 y sh963). En este trabajo, se utilizó el interferente sh40 que es capaz de restablecer la inducción de LC3II generada por lin+GO a la condición basal, y por otro lado, el interferente sh963 que fue utilizado como una situación de inhibición más extrema.

Para poder generalizar el resultado obtenido de que la muerte inducida por el sistema *lis/lin/GO* es

Figura 34: Estudio de la capacidad inhibitoria de la formación de LC3II de los shRNAs contra *atg5*. (A) En la parte superior se muestra la capacidad inhibitoria por inmunodetección de cada interferente contra *atg5*. En la parte inferior se muestra la inmunodetección del patrón de LC3 en células U-87 MG/*lis* infectadas con un lentivirus que codifica un shRNA control (shcontrol) o cuatro shRNAs (45, 40, 74 y 963) distintos contra *atg5* (shATG5) tratadas durante 12 h con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml). (B) Cuantificación de la relación entre LC3 II y LC3 I del experimento detallado en A.



mediada por autofagia, utilizamos, además del modelo de glioblastoma humano U-87 MG (Figura 35A), un cultivo primario de glioblastoma procedente de un paciente (Figura 35B). Esto nos permitiría generalizar, tanto la eficiencia de la terapia antitumoral que proponemos, como el mecanismo de ejecución de muerte celular observado. Así, vimos que el sistema *lis/lin/GO* genera una eficiente muerte celular y que las vacuolas

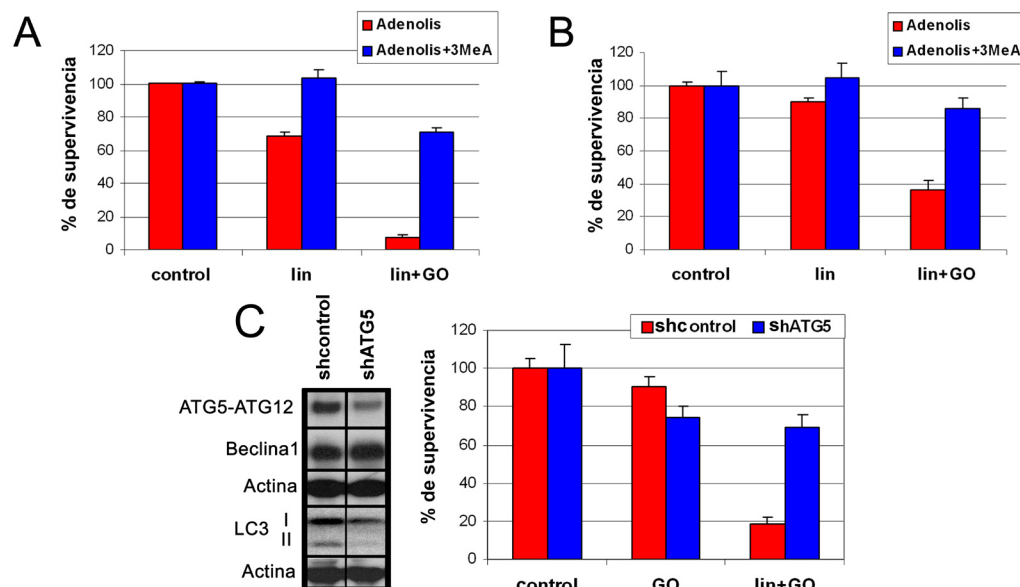


Figura 35: El sistema *l/lis/lin/GO* induce muerte mediada por autofagia en glioblastomas humanos.

(A) Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las células U-87 MG o (B) de un explante de un glioblastoma de un paciente que fueron infectados con *adeno/lis* (MOI: 10) y posteriormente tratados durante 48 h con *lin* (0,5 mg/ml) y *GO* (5 mUE/ml), según se indica y en presencia de 3-metiladenina (3MeA, 10 mM). (C) Inmunodetección de los niveles de ATG5-ATG12, Beclina 1 y LC3 respecto a actina en células U-87 MG/*lis* infectadas con un lentivirus que codifica un shRNA control (shcontrol) o contra *atg5* (shATG5). Porcentaje de supervivencia de estas células cuando son tratadas durante 36 h con *lin* y *GO* en las condiciones detalladas en A.

autofágicas participan en el proceso de muerte como se observa por el rescate de viabilidad obtenido con 3-metiladenina (Figura 35A y B) en ambos modelos evaluados. Resultados similares se pudieron obtener mediante silenciamiento génico con el RNA de interferencia sh963 (LV-shAtg5, Figura 35C) que bloquea eficientemente la muerte en células U-87 MG/*lis*, sin modificar otras proteínas relacionadas con autofagia, como Beclina1. Esto nos demuestra que la muerte inducida por el sistema *l/lis/lin/GO* es totalmente dependiente de la maquinaria de generación de vacuolas.

Participación de los lisosomas en la fase degradativa de la muerte por autofagia

Debido a la importante participación de la fase degradativa de la autofagia en la muerte, decidimos analizarla en profundidad. La primera premisa que quisimos evaluar es si las células presentaban vacuolas con contenido citoplasmático, en especial, mitocondrias dañadas por el efecto del cianuro, que, como se demostró previamente, genera una drástica fisión mitocondrial que podría facilitar su captura

por el sistema de vacuolas autofágicas. Para llevarlo a cabo elegimos el modelo de glioblastoma U-87 MG debido a que en estas células el sistema de muerte estimula una gran cantidad de vacuolas autofágicas concomitante al daño mitocondrial. Así pues, analizamos si las vacuolas autofágicas generadas por el sistema *lis/lin/GO* contenían contenido citoplasmático. Para lo cual se utilizó la co-transfección del plásmido pGFP-LC3 con otro que codifica la proteína DsRed2-mito, que es una proteína fluorescente roja con un péptido que la dirige específicamente a la mitocondria. Como puede observarse en la [Figura 36A](#), hay una co-localización total de las mitocondrias con las vacuolas

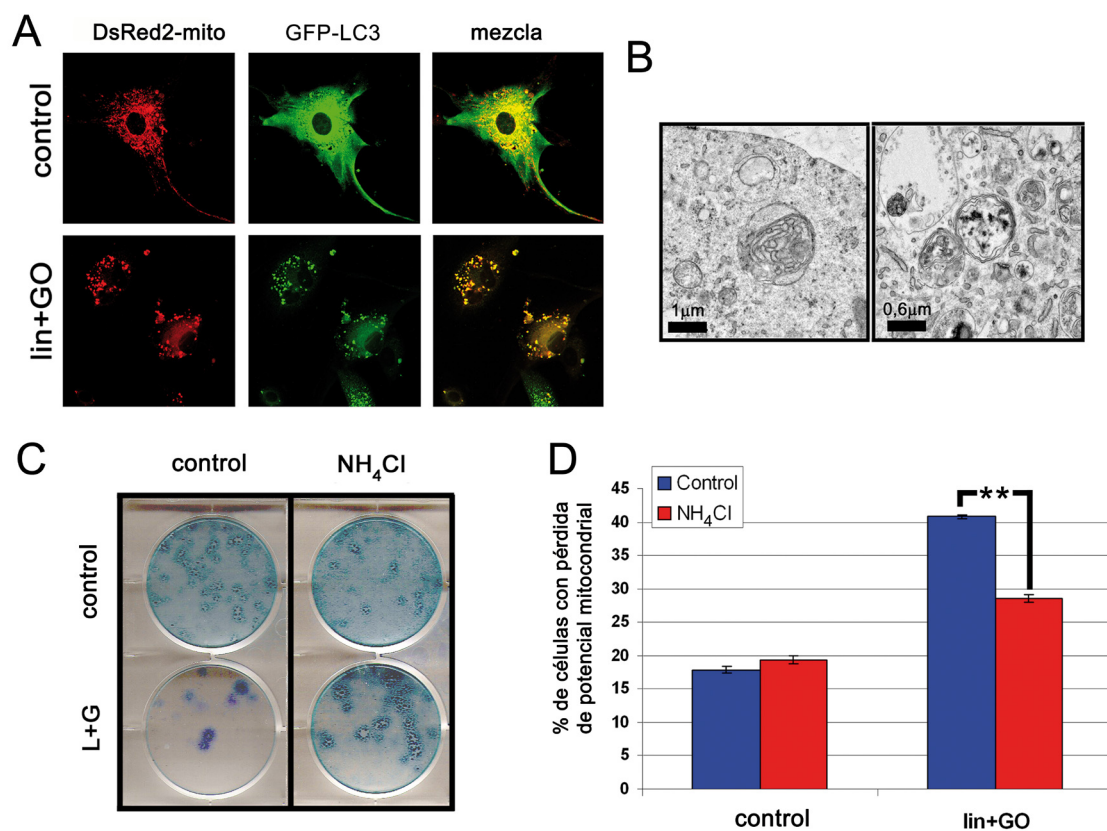


Figura 36: La mitofagia inducida por el sistema *lis/lin/GO*. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de las células U-87 MG/*lis* que expresan Ds-Red2-Mito y transfectadas con pGFP-LC3 tratadas con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml) durante 36 h. (B) Imágenes representativas de microscopía electrónica de células U-87 MG/*lis* 24 h tras el tratamiento con lin y GO, en las que se pueden observar vesículas de doble membrana con carga citoplasmática. Barras de calibración de 1 y 0,6 μ m, respectivamente. (C) Ensayo de formación de colonias de las células U-87 MG/*lis* tratadas durante 40 h con lin y GO como en A, y en presencia de 15 mM de NH₄Cl. Pasados 7 días del final del tratamiento las células se tiñeron con azul de metileno. (D) Porcentaje de células que presentan pérdida de potencial mitocondrial medido con la sonda DIOC₆(3) en células U-87 MG/*lis* tratadas durante 50 h igual que en C. Las gráficas muestran las medias y desviaciones estándar de 3 muestras independientes. **, $P < 0,001$.

autofágicas tras el tratamiento con lin/GO. También observamos vacuolas autofágicas con contenido citoplasmático por microscopía electrónica siguiendo el análisis realizado por otros autores (Eskelinen 2005)(Figura 36B).

A continuación analizamos la participación de los lisosomas en la muerte generada por el sistema *lis/lin/GO*, para lo cual evaluamos distintos inhibidores de la función lisosomal que también deberían inhibir la autofagia por eliminar el componente necesario para la degradación. De esta forma, estudiamos la monensina, la cloroquina, la bafilomicina A1 (Kondo et al. 2005; Kroemer y Jaattela 2005) o el cloruro de amonio (Amenta et al. 1978) (datos no mostrados). Algunos de estos compuestos no dieron resultados evidentes debido a que son demasiado tóxicos, como la monensina o la cloroquina, que lisan los lisosomas liberando compuesto citotóxicos, acidificando las células por lo que generan una muerte celular importante. Otros compuestos impiden el tráfico a los lisosomas, como la bafilomicina A1, que es un inhibidor de la ATPasa vacuolar lo que provoca la modificación de su pH y así todas las funciones lisosomales quedan bloqueadas (Klionsky et al. 2008). La bafilomicina A1 provoca la acumulación de compuestos tóxicos que llevan a la muerte celular. Por esta razón la bafilomicina A1 se ha utilizado a una concentración de 100 nM, que a pesar de que inhibe el 95% de la actividad ATPasa (Bowman et al. 1988; Yamamoto et al. 1998) podría no ser capaz de bloquear el proceso de fusión entre el autofagosoma y el lisosoma, debido a que principalmente está afectando al lisosoma y a su biogénesis (Klionsky et al. 2008). De esta manera, aunque la bafilomicina A1 tiene la capacidad de bloquear la muerte mediada por autofagia, la inhibición no es total porque no se puede utilizar concentraciones mayores o a tiempos prolongados debido a su toxicidad. Por otro lado, hemos encontrado que el cloruro de amonio es el único inhibidor de la función lisosomal que nos permitió bloquear parcialmente la función de los lisosomas inhibiendo la muerte autofágica sin inducir una toxicidad excesiva en las células control, como se observa en el ensayo de colonias que se muestra en la Figura 36C. Adicionalmente, utilizamos este inhibidor de los lisosomas para bloquear la muerte impidiendo la degradación de las mitocondrias, observando que era capaz de revertir la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en un alto porcentaje de células (Figura 36D).

Inducción de muerte por autofagia in vivo en un modelo de xenotransplante de tumores humanos

La eficiencia en la generación de autofagia por el sistema *lis/lin/GO* también se evaluó *in vivo*. Para ello se utilizó el RNA de interferencia sh40 para silenciar ATG5 en células U-87 MG*lis* y posteriormente éstas fueron inoculadas como xenotransplante en

ratones inmunodeficientes de la cepa *nude*. En este caso se eligió el interferente sh40 debido a que los que generan una mayor inhibición también afectan la proliferación y viabilidad a largo plazo de las células lo que podría afectar al éxito en la generación

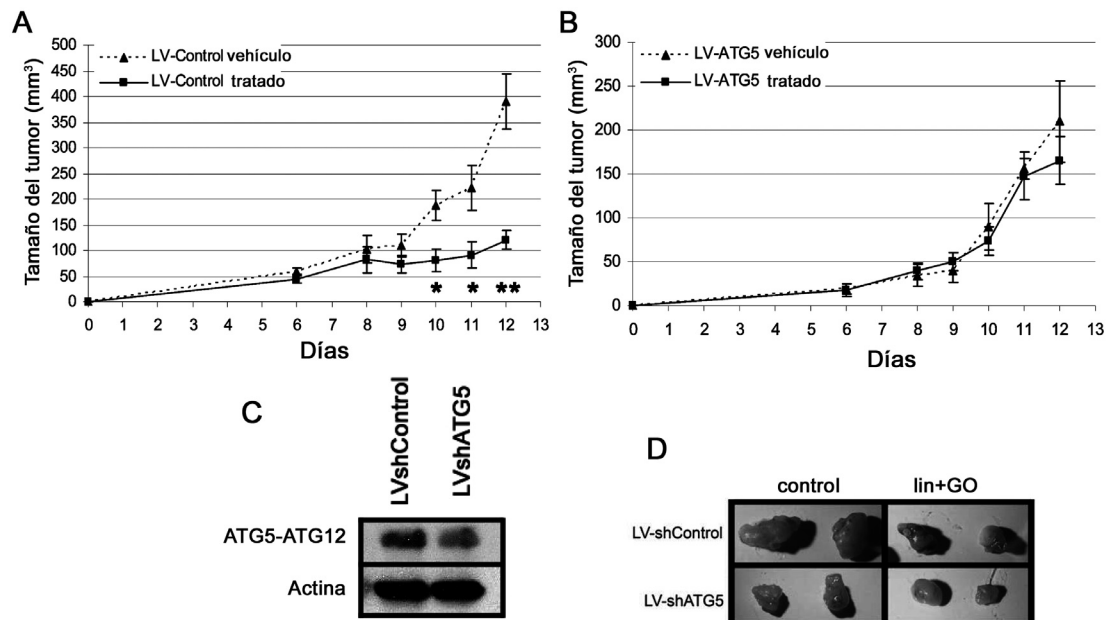


Figura 37: La inhibición de la autofagia impide el éxito de la terapia. (A-B) Crecimiento de los tumores de células U-87 MG/*lis* xenotransplantados en ratones inmunodeficientes cuando las células fueron infectadas con lentivirus que codifica un shRNA control (LV-Control, **A**) o frente a *atg5* (shATG5, **B**). Los tumores del lado derecho fueron tratados diariamente con lin (5 mg) y GO (2 UE) mientras que el izquierdo se trató sólo con el vehículo (suero fisiológico). Las gráficas muestran las medias y errores estándar de 6 ratones por grupo. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,001$. (C) Inmunodetección de los niveles de expresión de ATG5 en los tumores sin tratar al final del tratamiento. (D) Imágenes representativas de dos tumores de cada grupo una vez que finalizó el tratamiento.

del tumor. Cuando los tumores se hacían visibles con un tamaño aproximado de 50 mm³, estos fueron tratados con el sistema *lis*/lin/GO como se comentó anteriormente. Pudimos observar que la terapia ejerce un eficiente efecto antitumoral (**Figura 37A**), y que los tumores en los que se había inhibido la expresión de ATG5 (LVshATG5) son refractarios a la terapia (**Figura 37B**). También puede visualizarse que el tamaño de los tumores no tratados de la línea generada con el lentivirus con el RNAi contra *atg5* (LVshATG5) crecen menos que los que tienen el lentivirus control (LVshcontrol) (**Figura 37A** respecto a **B** y **Figura 37D**), lo que demuestra que las células tumorales necesitan el proceso de autofagia para mantener su homeostasis y su progresión normal.

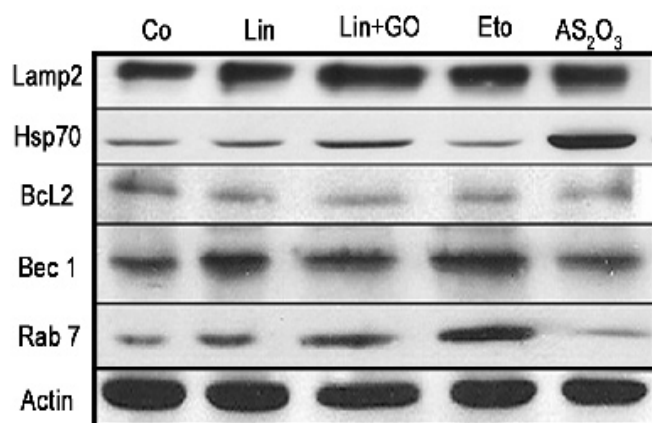


Figura 38: Patrón de expresión de proteínas relacionadas con autofagia. Inmunodetección de los niveles de las proteínas Lamp2, Hsp70, Bcl2, Beclina 1 y Rab7 respecto a actina en las células U-87 MG/ls a las 48 h del tratamiento con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml), etopósido (Eto, 50 μ M) y As₂O₃ (6 μ M).

Estudio de proteínas implicadas en el mecanismo de autofagia

La inducción de autofagia mediada por el sistema combinado correlaciona con el aumento de las proteínas que están involucradas en la estimulación del sistema de macroautofagia, tales como Beclina1, acompañado con un descenso de Bcl2 (Figura 38). Ambas proteínas generan un sistema de inducción-represión, como ha sido demostrado recientemente controlando de forma coordinada la generación de vacuolas autofágicas (Wei et al. 2008; Park et al. 2009). Por otro lado proteínas como Rab7 (Jager et al. 2004) y Lamp2 (Gonzalez-Polo et al. 2005; Fehrenbacher et al. 2008) podrían favorecer la generación y fusión de lisosomas con las vacuolas autofágicas maximizando la fase degradativa de este sistema argumentando la eficiente muerte autofágica observada (Figura 38).

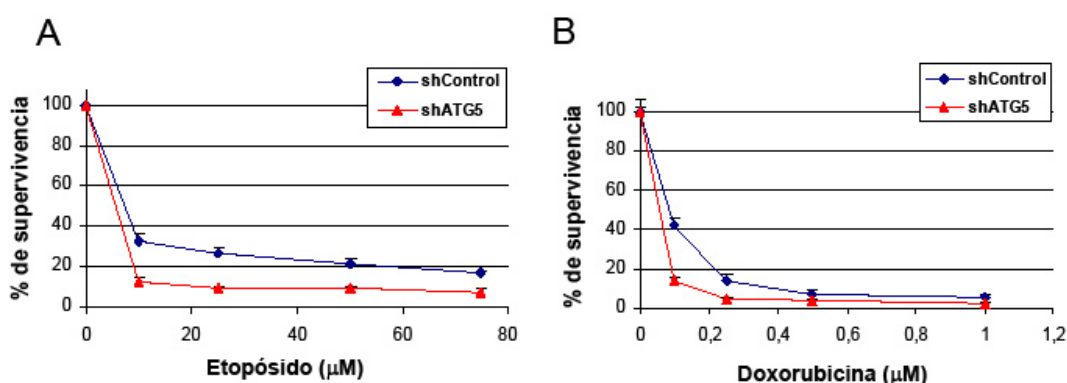


Figura 39: La inhibición de la autofagia sensibiliza al daño al DNA. Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las células U-87 MG tratadas durante 96 h con concentraciones crecientes de (A) etopósido (μ M) o (B) doxorubicina (μ M) y cuando estas células son infectadas con un lentivirus que codifica un RNAi contra *atg5*. Las gráficas muestran las medias y desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

Estrecha relación entre apoptosis y autofagia: el bloqueo de los mecanismos de generación de autofagia facilita la activación de apoptosis y viceversa

La muerte estudiada aquí en el modelo de U-87 MG presenta una importante disfunción mitocondrial que se muestra en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y del patrón mitocondrial de citocromo c. Este es un aspecto que no había sido descrito previamente para una muerte gobernada por la inducción de vacuolas autofágicas. Para averiguar la relación entre las dos rutas de muerte, autofagia y apoptosis, nosotros analizamos si las células se sensibilizaban a la muerte por quimioterapéuticos cuando la autofagia estaba bloqueada mediante el RNA de interferencia contra *atg5*. Como se muestra en las cinéticas de supervivencia frente a cantidades crecientes de etopósido y doxorubicina, la inhibición de autofagia genera una sensibilidad a estas sustancias (Figura 39A y B), por lo que podría especularse que existe una participación de la autofagia en la defensa contra el daño al DNA.

También se ha estudiado más en profundidad a nivel mitocondrial, por qué las

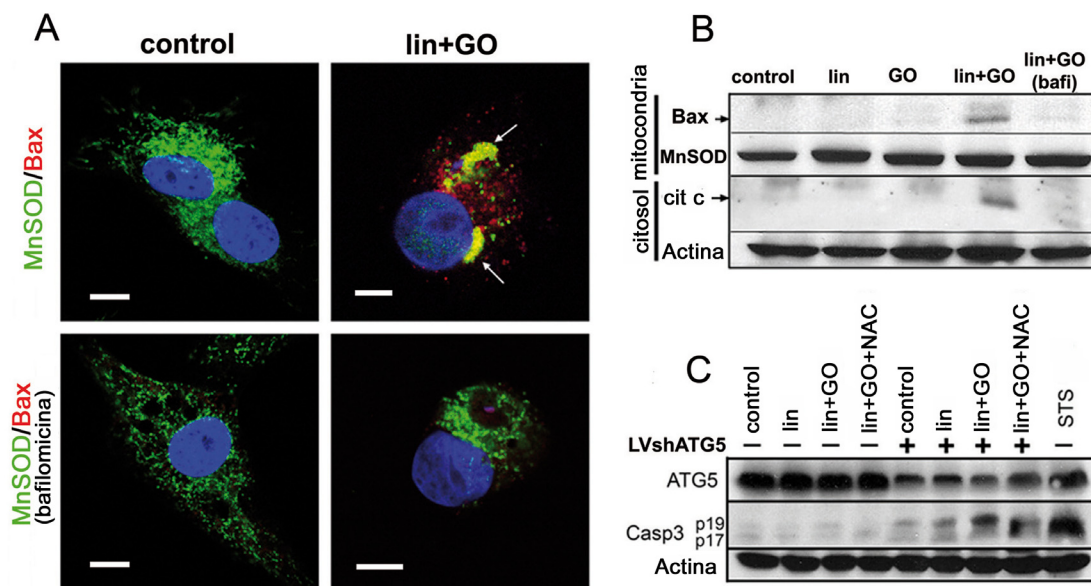


Figura 40: La intercomunicación entra apoptosis y autofagia. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran la localización subcelular de Bax (rojo) y MnSOD (verde) en las células U-87 MG/lis tratadas durante 48 h con lin (0,5 mg/ml) y GO (5 mUE/ml) y en presencia de bafilomicina (100 nM). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas muestran la colocalización de ambas proteínas. Barra de calibración de 10 μ m. (B) Inmunodetección de la proteína Bax en extractos mitocondriales y de citocromo c en extractos citosólicos de células U-87 MG/lis tratadas como se indicó en A. (C) Inmunodetección de los niveles de expresión de ATG5 y caspasa 3 activa en células U-87 MG/lis que expresan un shRNA contra *atg5* (shATG5) o un shRNA control (-) tras un tratamiento con lin, GO y NAC (10 mM) y estaurosporina (STS, 1 μ M).

células tratadas con el sistema *lis/lin/GO*, no activan las caspasas aunque presentaran pérdida del potencial de membrana mitocondrial y de tinción de citocromo c. Para ello analizamos si Bax era activada durante el proceso de muerte. En un estudio de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo contra la forma activa de Bax (clone 6A7, BD Pharmingen, (Boya et al. 2003)) pudimos observar que, en la condición de inducción de autofagia, hay una activación directa de Bax, que se transloca a la mitocondria y co-localiza con la superóxido dismutasa de manganeso, MnSOD (Figura 40A). Además, esta translocación puede ser inhibida por bafilomicina A1 a 100 nM, lo que demuestra que el proceso de translocación/activación puede depender de la función de los lisosomas, como se había mostrado anteriormente. Este resultado sorprendente fue confirmado por fraccionamiento subcelular, donde se pone de manifiesto que existe tanto una translocación de Bax a la mitocondria, como una liberación de citocromo c al citosol, y este proceso también es inhibido al bloquear la función de los lisosomas (Figura 40B). A pesar de que ocurre la translocación de Bax y la liberación de citocromo c, la vía la activación de caspasas no parece estar implicada. Por ello nos preguntamos si las vacuolas autofágicas podrían estar capturando mitocondrias dañadas o con bajo potencial de membrana mitocondrial y así bloquear la activación de las caspasas efectoras. Seuguidamente se evaluó la inducción de muerte con *lis/lin/GO* en ausencia de formación de vacuolas autofágicas utilizando el silenciamiento de *atg5* con RNA de interferencia. Esto, como puede observarse en la Figura 40C, permite la activación de

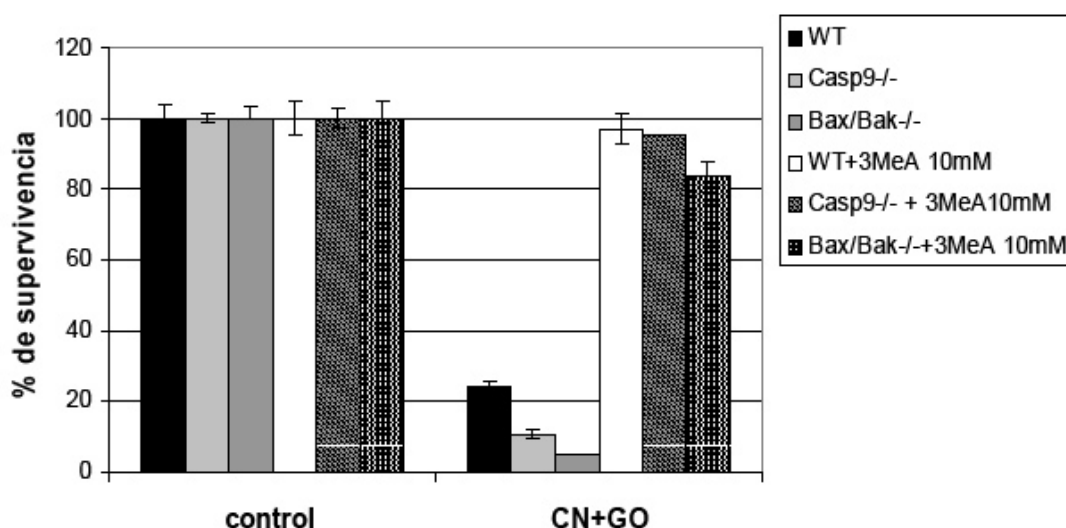


Figura 41: Independencia de caspasas y Bax de la muerte por cianuro y glucosa oxidasa.

Porcentaje de supervivencia medido por MTT de los MEFs de genotipo salvaje (WT), deficientes para caspasa 9 (casp9^{-/-}) o deficientes para *bax/bak* (Bax/Bak^{-/-}) tratados durante 24 h con cianuro potásico (0,4 mM) y GO (5 mUE/ml) y en presencia de NAC (10 mM). Las gráficas muestran las medias y desviaciones estándar de 4 muestras independientes.

la vía de las caspasas que se demuestra por la aparición de la caspasa 3 activa p19 y p17. Nosotros, por tanto, postulamos que, debido a la intensa mitofagia mostrada en la [Figura 36A](#) causada por el sistema *lis/lin/GO*, la activación de la caspasas queda enmascarada dentro de las vacuolas autofágicas y la apoptosis queda bloqueada en este punto.

A pesar de que observamos que Bax se translocaba a la mitocondria en nuestro modelo terapéutico, nosotros proponemos que debido a que el sistema *lis/lin/GO* es un inductor específico de autofagia, no se ve afectado por la deficiencia de las proteínas pro-apoptóticas como caspasa 9 y Bax/Bak y, en esas condiciones, se sigue provocando una muerte mediada por autofagia que es inhibida por 3-metiladenina ([Figura 41](#)).

El conjunto de estos resultados demuestran que el sistema de inducción de muerte autofágica podría eliminar eficientemente células tumorales e incluso, las células que tienen impedida la inducción de apoptosis dependiente de caspasas que suelen ser resistentes a la mayoría de los antitumorales.

La transformación tumoral sensibiliza a las células a morir por autofagia demostrando su potencial terapéutico

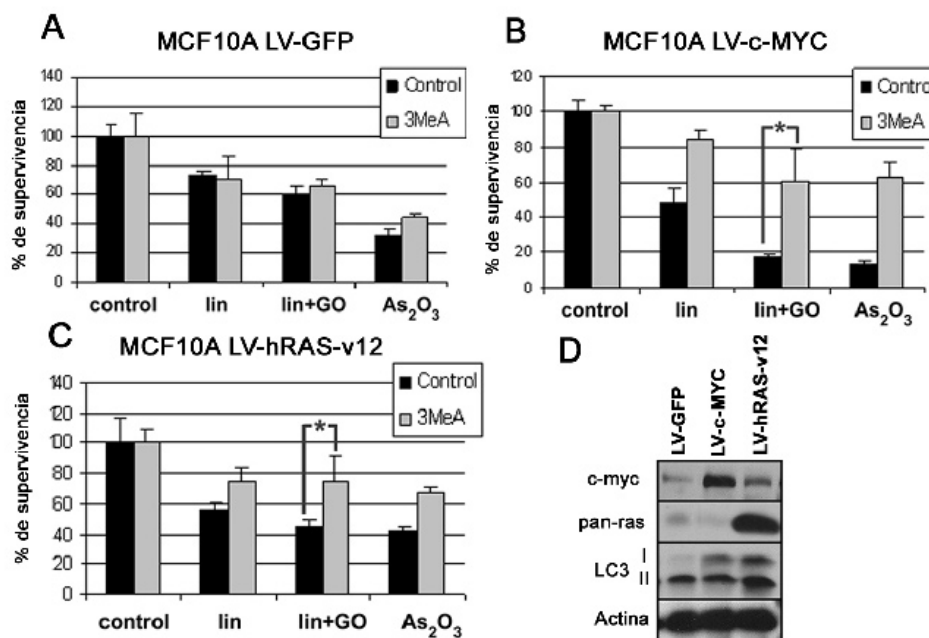
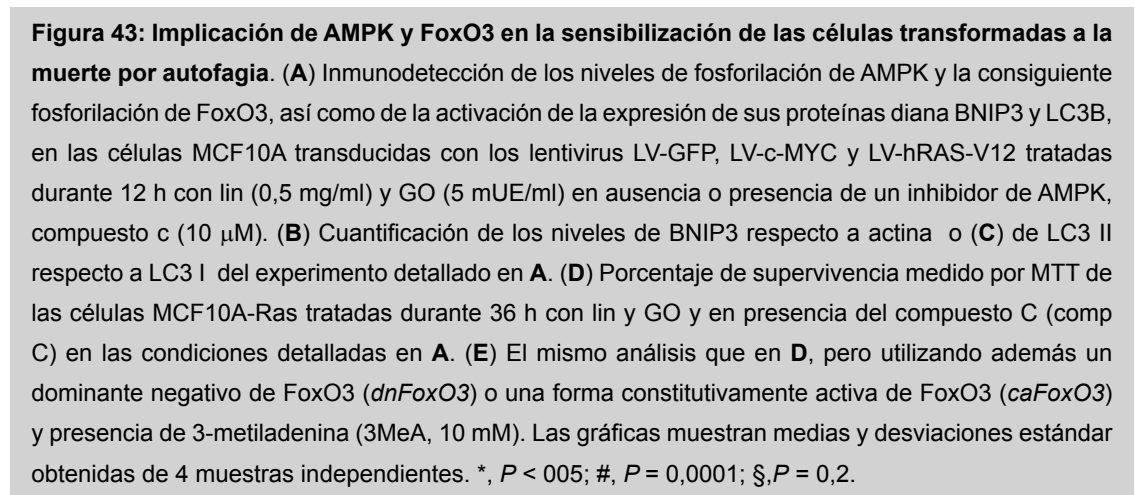


Figura 42: La transformación celular sensibiliza a la muerte por autofagia. Porcentaje de supervivencia medido por MTT de las células MCF10A tratadas durante 48 h con lin (0,5 mg/ml), GO (5 mUE/ml) y As₂O₃ (6 μM), y en presencia de 3MeA (10 mM), cuando estas células fueron infectadas con lentivirus que codifican GFP (**A**), c-MYC (**B**) y hRAS-V12 (**C**). (**D**) Inmunodetección de la expresión de los oncogenes *c-myc* y *ras* y el patrón de LC3 en la células anteriores.



se establecieron cultivos estables por transducción mediante vectores lentivirales con distintos oncogenes como *c-myc* (Amaravadi et al. 2007; Thibodeaux et al. 2008) y *ras* (HrasVal12) (Datta et al. 2007) y un vector control que codifica GFP. Estas líneas transformadas se trataron posteriormente con adenolis, lin y GO o con trióxido arsénico y mostraron una mayor dependencia de la generación de autofagia en todos los casos respecto a las células control que, además, era inhibida por 3-metiladenina (Figura 42A-C). Como estas células transformadas resultaron ser más sensibles a la inducción de autofagia, nos preguntamos si estos oncogenes modificaban la generación de vacuolas. Sorprendentemente, encontramos un incremento de la cantidad total de LC3B, más que una inducción de vacuolas autofágicas que se vería reflejado en la transformación de LC3 I en II (Figura 42D). En relación a esto, se ha demostrado recientemente en modelos de senescencia, inducidos por *ras* y atrofia muscular, que el factor de transcripción FoxO3 tiene la capacidad de controlar la expresión de una serie de genes relacionados con autofagia, como LC3B y BNIP3, entre otros (Mammucari et al. 2007; Zhao et al. 2007; Young et al. 2009). Para evaluar esta vía en nuestro modelo, analizamos los niveles de LC3B y BNIP3 observando que estaban incrementados, al igual que la fosforilación de la quinasa activada por AMP (AMPK) (Figura 43 A y B), lo que también había sido descrito en condiciones similares para la inhibición de función citoplasmática de p53 (Tasdemir et al. 2008). Además, la inducción de estos genes relacionados con autofagia podía ser inhibida por el compuesto C, un inhibidor específico de AMPK (Figura 43 A), que también es capaz de bloquear la muerte inducida por el sistema *lis/lin/GO* (Figura 43D). En conclusión, se podría decir que hay una unión directa entre el aumento de la fosforilación de la AMPK y la inducción de BNIP3 y LC3B.

En relación con lo anterior recientemente se había documentado que AMPK mediaba una regulación positiva de FoxO3 (Greer et al. 2007), quisimos comprobar si la activación de la muerte por autofagia mediada por AMPK dependía de la actividad de FoxO3, debido a que este factor de transcripción puede controlar los genes BNIP3 y LC3B. Para ello utilizamos un dominante negativo (*dnFoxO3*) y una forma constitutivamente activa (*caFoxO3*) de FoxO3. Así pues, se observó que *dnFoxO3* bloqueaba la inducción de autofagia, mientras que, por el contrario, *caFoxO3* la estimulaba (Figura 43E). En conclusión, se podría decir que las células transformadas son más sensibles a la inducción de muerte por autofagia que las células no transformadas al ser expuestas al sistema combinado *lis/lin/GO*, lo cual, en nuestro caso, está mediado por el eje AMPK-FoxO3.

discusión

Capacidad citotóxica y terapéutica del sistema *lis/lin/GO*

El conocimiento de cómo mueren las células y de cómo ocurren estos procesos durante el desarrollo de un tumor nos permitirán diseñar nuevas terapias contra el cáncer. Se han utilizado muchos compuestos con el propósito de eliminar a las células tumorales, pero éstas comúnmente tienen defectos en los mecanismos de muerte, por ello, es necesario encontrar nuevos agentes pro-muerte más específicos para erradicar los tumores. A este respecto, en casi todos los tipos de tumores se observan modificaciones que bloquean las principales vías de activación de apoptosis e incluso pueden llegar a provocar la inducción de oncosis, debido al ambiente hostil que supone el tumor debido a la falta de nutrientes o hipoxia. La estimulación de muerte necrótica, en la mayoría de los casos, suele favorecer el crecimiento del tumor por estimulación de la angiogénesis o el desarrollo de metástasis. Nosotros hemos encontrado en este trabajo que el desarrollo de agentes antitumorales debería probablemente estar focalizado hacia la inducción de mecanismos específicos de muerte, como la autofagia, que son más eficientes en su efecto anticancerígeno que los fármacos inductores de una parada de la proliferación o de la muerte por apoptosis.

La evaluación de diversos agentes antitumorales refleja que algunos de estos compuestos pueden generar una muerte mediante la desestabilización metabólica que es efectiva en la mayoría de las células tumorales (Bouchier-Hayes et al. 2005; Jin et al. 2007; Kroemer y Pouyssegur 2008). La mitocondria ocupa el punto central del metabolismo y de la muerte celular, ya que, integra las señales de supervivencia y funciona como un sensor y coordinador de la muerte. En este trabajo se han estudiado diversos compuestos que afectan a la mitocondria y estimulan la muerte de la célula.

Muchos fármacos que dañan la mitocondria son extremadamente tóxicos para poder ser utilizados como terapias antitumorales, pero sí se ha observado que son eficientes para matar a todos los tipos de células tumorales. Por ejemplo, se ha documentado una gran variedad de estos agentes (Bouchier-Hayes et al. 2005) algunos de los cuales han sido utilizados como antitumorales y, en ciertos casos como la antimicina A, además de afectar a la mitocondria a nivel de la cadena de transporte de electrones, tienen la capacidad de operar a nivel de la regulación de muerte celular bloqueando Bcl-2 y matando a las células tumorales (Tzung et al. 2001)

El sistema *lis/lin/GO* presentado en esta tesis ha demostrado ser muy eficiente para matar las células tumorales. Uno de los aspectos más importantes de esta terapia es el potente efecto colateral que tiene asociado, ya que, tanto el cianuro como el peróxido de hidrógeno, son moléculas que difunden libremente pudiendo cruzar las membranas celulares afectando a las células adyacentes, hayan recibido o no el gen

de la linamarasa (Cortes et al. 2002). A pesar de esto, un aspecto complejo para la posible aplicación terapéutica de este sistema, es la aparición de posibles efectos secundarios adversos ya que, si no es administrado de forma específica y controlada en el entorno del tumor, podría generar una toxicidad sistémica indeseada. Sin embargo, el efecto colateral del sistema que proponemos resulta beneficioso para la eliminación de determinados tipos de tumores como los glioblastomas en los que es imprescindible matar las células cancerosas que se infiltran en el tejido normal. La posible toxicidad colateral de este sistema enzima-prodroga podría ser controlada limitando la aplicación de alguno de los dos componentes que lo constituyen. Por un lado, se podría regular la expresión de la enzima linamarasa mediante vectores virales específicos de tumores, por ejemplo, utilizando promotores de expresión controlada por factores de transcripción que sólo se expresen en células cancerígenas. Un posible promotor candidato podría ser el del gen de la survivina que se expresa sólo en el tejido embrionario o en los tumores y sus niveles de expresión en el tejido normal son muy bajos o casi nulos (Zhu et al. 2004; Van Houdt et al. 2006; Ulasov et al. 2007; Wang et al. 2009). Por otro lado, se podría controlar la administración de la linamarina, el sustrato inocuo, que es lo que se ha utilizado en el tratamiento de los tumores en flancos de ratones. Otros sistemas de administración más sofisticados son los que utilizan reservorios y cánulas que liberan las sustancias con un flujo constante directamente al tumor, con lo que se consigue reducir el efecto tóxico sistémico aumentando la actividad antitumoral. Estos últimos están siendo evaluados actualmente en nuestro laboratorio para la aplicación de esta terapia en modelos de tumores cerebrales en ratas con resultados exitosos.

Por otro lado, varias estrategias de inducción de muerte celular específica reflejan que determinadas dianas celulares pueden ser eficientes para la inducción de un efecto terapéutico específico. Un caso son los compuestos que afectan a los lisosomas, que generan un efecto antitumoral muy potente muy probablemente debido a su capacidad de estimular muerte independiente de casapsas (Amaravadi et al. 2007; Fehrenbacher et al. 2008; Maclean et al. 2008; Gronbaek y Jaattela 2009; Ivanov et al. 2009). Sólo un reducido número de agentes que han demostrado ser inductores de autofagia han sido evaluados como terapias antitumorales, a pesar de que son capaces de inducir ambas caras de la autofagia, tanto supervivencia como muerte (Kondo y Kondo 2006; Williams et al. 2008). El sistema *lis/lin/GO*, que combina la producción de cianuro con el estrés oxidativo, ha demostrado ser uno de los inductores de muerte mediada por autofagia más eficientes que se hayan descrito hasta el momento, exhibiendo un gran potencial en la reducción del crecimiento de tumores agresivos (García-Escudero y Gargini 2008; García-Escudero et al. 2008).

Cambio entre pérdida o mantenimiento de la integridad de membrana plasmática

En el modelo terapéutico que hemos estudiado, observamos que el perfil de muerte pasa de ser necrótico a otro con características apoptóticas, lo que coincide con el paso del sistema *lis/lin* al sistema combinado *lis/lin/GO* en las células W&W. Por otro lado, en los glioblastomas humanos, el sistema combinado provoca un perfil de tipo necrótico en U-373 MG y apoptótico en U-87 MG, en función de la integridad de la membrana plasmática. Este resultado es muy sorprendente debido a que la mayoría de los compuestos estudiados por otros autores cambian de un perfil apoptótico a necrótico al aumentar su cantidad por toxicidad específica o inespecífica (Festjens et al. 2006). En un gran número de casos, esto se debe a la acumulación de estrés oxidativo asociado; que a niveles moderados provocan un perfil apoptótico pero a mayores concentraciones pasa a inducir necrosis, debido a que el daño que se genera en la célula puede llevar al mal funcionamiento de los mecanismos de regulación y activación de las caspasas (Clement et al. 1998). Sin embargo, en el caso que hemos estudiado esto ocurre de forma inversa. Como se observa en la [Figura 28](#), en las células W&W el estrés oxidativo es mayor en el sistema combinado que en el sistema *lis/lin*, sin embargo, como se muestra en la [Figura 12](#), el sistema *lis/lin* tiene una muerte con perfil de ruptura de membrana plasmática y la adición de glucosa oxidasa lo transforma un perfil de muerte con mantenimiento de la integridad de ésta. Una posible explicación es que, como se pudo demostrar en esta tesis, la combinación *lis/lin* con glucosa oxidasa en células W&W/*lis* induce el incremento de la formación de vacuolas autofágicas ([Figura 30](#)) debido al aumento del estrés oxidativo, lo que provoca extensa mitofagia ([Figura 36](#)), generando un desequilibrio que estimula la degradación excesiva y la consecuente muerte de la célula con pérdida de potencial mitocondrial.

Por otro lado, la muerte con ruptura de membrana plasmática que ocurre en el modelo de U-373 MG, muestra una dependencia de vacuolas autofágicas y una independencia de ruptura de lisosomas. El proceso se bloquea con 3-metiladenina, con el interferente de *atg5* y bafilomicina A1, y no se inhibe por necrostatina 1. Este perfil de muerte no había sido documentado anteriormente. La situación aquí descrita es contraria a la que ocurre en la necroptosis, donde se observa inducción de vacuolas autofágicas que son inhibidas por necrostatina 1. Además, esta muerte no puede ser bloqueada por 3-metiladenina o por la falta de genes como *atg5* o *beclina 1* (Degterev et al. 2005). Uno de los aspectos más relevantes de la necroptosis es su independencia de estrés oxidativo en algunos casos, siendo, sin embargo, el estrés oxidativo común en casi todos los tipos de muerte celular donde la autofagia cumple un papel importante (Chen

y Gibson 2008; Chen et al. 2008). En conclusión, la muerte que nosotros observamos en el sistema *lis/lin/GO* en U-373 MG, pese a tener un perfil de muerte de tipo necrótico por la pérdida de la integridad de membrana plasmática, no se puede considerar una muerte mediada por necroptosis y es una muerte celular que depende de la generación de vacuolas, pero no de la degradación de la mitocondria.

Lisosomas: ¿Es Hsp70 un protector universal de la muerte celular?

Aunque existe una gran cantidad de información sobre la implicación de los lisosomas en la muerte celular, todavía resulta difícil establecer de forma clara el modo en el que éstos participan y la regulan. Partiendo de la base de que estos orgánulos celulares contienen los productos más tóxicos y que pueden estimular diversos tipos de mecanismos de muerte (Boya y Kroemer 2008), su intervención presenta múltiples facetas. Muchos trabajos han demostrado que los lisosomas están implicados en diversas formas de muerte, como en la apoptosis y necrosis, mediante la liberación de catepsinas, así como en las muertes en las que se genera mucho estrés oxidativo, por lo que constituyen uno de los reguladores fundamentales de la muerte celular. Pero la implicación de estos orgánulos en muerte es compleja ya que pueden controlar tanto la degradación como la producción de compuestos tóxicos. A este respecto, se ha demostrado la implicación de proteínas como p53, Lamp1/2 o Hsp70 (Boya et al. 2003; Kroemer y Jaattela 2005) en la integración de las señales que regulan la muerte mediada por los lisosomas.

En este trabajo, se ha estudiado la posible implicación de Hsp70 en la muerte debido a que esta proteína participa en la protección celular ante diversas situaciones de estrés celular, apantallando el efecto perjudicial y bloqueando múltiples pasos en el desarrollo de la muerte celular. En primer lugar observamos que, en el modelo de U-87 MG donde las células mueren manteniendo la integridad de la membrana plasmática, la sobre-expresión de *hsp70* retrasa la muerte de las células mediada por *lis/lin/GO*, como era de esperar por su papel protector. Sin embargo, en el modelo de U-373 MG en donde las células mueren con ruptura de la membrana plasmática, la sobre-expresión de *hsp70* acelera la muerte y, además, bloquea el efecto de protección generado por la bafilomicina A1. Esto nos induce a pensar que cuando la célula muere con ruptura de membrana plasmática, la Hsp70 favorece este proceso de muerte. Estos resultados concuerdan con lo observado en los fibroblastos deficientes en *hsp70*, en los que se producía un retraso de la muerte por cianuro o cianuro en combinación con glucosa oxidasa, lo que implicaría de forma directa a esta proteína en la inducción de muerte.

El efecto que hemos observado en el retraso de la ejecución de muerte cuando se inhibe la expresión de la *hsp70* evidencia que esta proteína puede ejercer un efecto de sensibilización o de pro-muerte en determinadas circunstancias, lo que es contrario a la mayoría de los datos publicado anteriormente sobre la Hsp70 (Arya et al. 2007). Se podrían hacer varias especulaciones sobre la participación de Hsp70 en este punto, pero debido a la gran diversidad de dianas sobre las que esta proteína podría estar actuando, podríamos hacer una interpretación simplista para la situación observada. Una posible explicación sería que debido a su actividad de chaperona, podría estabilizar la función de AKT, que recientemente se ha descrito que favorece el perfil necrótico (Wu et al. 2009), aunque no se ha demostrado una relación directa entre estas proteínas.

En conclusión, uno de los resultados más provocadores presentados en esta tesis es el posible papel diferencial de la Hsp70 en la muerte con o sin integridad de la membrana plasmática, lo que nos permitiría especular sobre un papel directo de esta chaperona en una regulación pro-muerte en los tipos de muerte con perfil necrótico.

El papel de la mitocondria en la muerte desencadenada por el sistema */is/lin/GO*

Algunos inhibidores de la cadena de transporte de electrones, tales como la rotenona o TFI_{II}, pueden generar una rápida muerte por autofagia, pero, a pesar de ello, no han sido evaluados como antitumorales. Otros, como el trióxido de arsénico, parecen generar un efecto terapéutico importante en varios tipos de tumores, pero su aplicación terapéutica se ha visto limitada debido a los efectos tóxicos secundarios. Una de las aplicaciones terapéuticas más eficientes es la utilización de concanavalina A en tumores hepáticos en los que se ha puesto de manifiesto la capacidad que tiene la inducción de muerte autofágica como un potente mecanismo antitumoral (Chang et al. 2007).

La autofagia actúa como un proceso de protección celular en la mayoría de las situaciones (Weihua et al. 2008; Herrero-Martin et al. 2009), pudiendo incluso generar resistencia a la activación de caspasas y, por tanto, resistencia a los agentes quimioterapéuticos habituales. También se ha demostrado que la estimulación de autofagia puede llegar a bloquear la activación de caspasas mediada por estaurosporina (Ravikumar et al. 2006). Esta propiedad de la autofagia se pone de manifiesto en el sistema */is/lin/GO*, donde la mitocondria cumple un papel central. El tratamiento combinado induce una mitofagia que abarca a toda la célula y que puede extenderse hasta el punto de apantallar la activación de caspasas por encapsulamiento de las mitocondrias dañadas en vesículas autofágicas, a pesar de que se produzca la

translocación de Bax y la liberación de citocromo c. Una posible explicación a este hecho podría ser que, tras la translocación de Bax, los complejos de activación de caspasas quedaran literalmente encerrados en las vacuolas autofágicas y fueran degradados. Esto concuerda con la pérdida de la tinción de citocromo c observada por inmunofluorescencia, muy probablemente, debida a la acción degradativa de los lisosomas. Esta especulación se basa en que, cuando bloqueamos la formación de vacuolas autofágicas, la activación de caspasas progresa hasta la visualización de la caspasa 3 activa observada en la [Figura 40C](#). A pesar de que previamente habíamos especulado que la falta de activación de caspasas podría deberse a los bajos niveles de ATP que se observaban tras el bloqueo de la cadena de transporte de electrones por el cianuro producido por el sistema *lis/lin* (Garcia-Escudero et al. 2008), nuestros resultados actuales demuestran que esto no es correcto. Además, la autofagia es una fuente de obtención de ATP (Colell et al. 2007) y al bloquearla deberían disminuir aún más los niveles de ATP celulares, sin embargo, la activación de caspasas progresa, con lo que se podría concluir que unos niveles muy bajos de ATP intracelulares pueden alcanzar para mantener las funciones necesarias para la inducción de la muerte apoptótica mediada por caspasas.

Por otro lado, pocos agentes inductores de muerte han demostrado ser tan eficientes en generar muerte por autofagia como el sistema combinado *lis/lin/GO*, con un patrón de mitofagia y una alta dependencia de la función lisosomal en los modelos de W&W y U-87 MG. Son necesarios más estudios para interpretar los resultados obtenidos en U-373 MG donde las vacuolas autofágicas están involucradas en un mecanismo en el que las células mueren con pérdida de integridad de membrana plasmática. Aunque, esta situación podría ocurrir si hubiese una incapacidad de captación del contenido citoplasmático o una disfunción en la fusión de las vacuolas con los lisosomas. La evaluación de esto presenta la dificultad añadida de que todavía no se han establecido las moléculas involucradas en la regulación y función de estos dos pasos fundamentales. Por un lado la captación “específica” de las mitocondrias por las vacuolas y, por otro lado, el desconocimiento de los reguladores de la fusión con los lisosomas que controlan la fase degradativa. Acerca de la captación específica por las vacuolas autofágicas de determinados componentes del citoplasma, como las mitocondrias, podrían estar implicadas cuatro proteínas, BNIP3, NIX, GABARAP (Zhang y Ney 2009) y Parkina (Narendra et al. 2008), aunque su función y regulación es mucho más compleja de lo que se había propuesto en los primeros trabajos (Kanzawa et al. 2005). Por ejemplo, la proteína BNIP3 fue descrita por primera vez como una proteína pro-apoptótica de la familia de Bcl-2, ya que contiene una región BH3 (Tracy y Macleod 2007), al igual que NIX, aunque posteriormente se demostró que desempeñaba una

función reguladora de la muerte por autofagia (Daido et al. 2004; Kanzawa et al. 2005). Esta proteína podría participar en la captación de la mitocondria por las vacuolas autofágicas y, así, actuar como el nexo de unión entre la inducción de autofagia y apoptosis. También, se ha asumido una asociación directa de BNIP3 con la inducción y regulación de Bax y del poro de transición de la membrana mitocondrial, aunque su función es aún discutible ya que no hay ninguna relación directa con Bax. A pesar de esto, se ha demostrado que BNIP3 puede estar involucrada tanto en supervivencia (Zhang y Ney 2009) como en muerte celular, ya sea en apoptosis, en necrosis (Vande Velde et al. 2000) o en autofagia (Tracy et al. 2007). Nosotros especulamos que BNIP3, GABARAP y la familia de Atg4 (Autofaginas), pueden jugar un papel en la decisión de estimulación de muerte celular mediada por autofagia. Más adelante se comenta su participación en el sistema de inducción de muerte, *lis/lin/GO*, en el apartado de, *Autofagia, apoptosis y tumorigénesis conducida por oncogenes*.

Al explorar el mecanismo de muerte subyacente del sistema *lis/lin/GO* en los modelos celulares de W&W/*lis* y U-87 MG/*lis* observamos un deterioro importante de la función mitocondrial en ausencia de activación de caspasas y con la membrana plasmática intacta. En estas circunstancias, se produce la pérdida de potencial mitocondrial y de la estructura filamentosa en espagueti característica de la mitocondria en estado sano, en un proceso denominado fisión mitocondrial (Perfettini et al. 2005; Youle y Karbowski 2005). La observación de que los compuestos que interfieren con la cadena de transporte de electrones rompen la red filamentosa de la mitocondria había tenido lugar bastante tiempo atrás (Lyamzaev et al. 2004). A pesar de que éste podría parecer un proceso drástico para la célula, puede ser revertido rápidamente por un mecanismo descrito recientemente en el que están implicadas proteínas de fusión de tipo GTPasa similares a la dinamina (Szabadkai et al. 2004). Este proceso de fisión y fusión mitocondrial tiene un carácter dinámico que, en algunos casos, incluso puede actuar como un mecanismo de control de inducción de muerte (Twig et al. 2008), oponiéndose a la activación de apoptosis. En este caso, las mitocondrias dañadas o con bajo potencial mitocondrial se liberan de la red mitocondrial mediante su fisión y son eliminadas, lo que bloquea la transmisión de la señal de muerte a través de la red mitocondrial interrumpiendo la transición de permeabilidad mitocondrial y, por tanto, la muerte (Szabadkai et al. 2004).

Cuando se combina el sistema *lis/lin* con la glucosa oxidasa en células W&W/*lis* se produce el cambio de un patrón de muerte con pérdida de integridad de membrana plasmática a otro caracterizado por presentar la membrana plasmática intacta y externalización de fosfatidilserina. Es importante resaltar que en este proceso las mitocondrias sufren un hinchamiento mostrado en las imágenes de microscopía confocal

de la [Figura 27](#). Todos estos procesos ocurren sin activación de caspasas, ni participación de AIF. Nosotros especulamos que cuando se combina el sistema *lis/lin*, que provoca la fisión de las mitocondrias, con la glucosa oxidasa, que induce una mayor cantidad de vacuolas autofágicas, el sistema se hace más eficiente en degradar mitocondrias por mitofagia y, entonces, el perfil de muerte cambia. Recientemente se ha demostrado que la fragmentación mitocondrial favorece el reciclado de las mitocondrias dañadas por el sistema de degradación de macroautofagia (Twig et al. 2008). En este caso, la autofagia podría captar y reciclar más eficientemente las mitocondrias que pierden de potencial cuando se fragmentan y se separan de la red filamentosa, lo cual, si persiste, podría desencadenar la muerte de la célula. En relación a esto, se ha demostrado que la degradación selectiva de las mitocondrias por autofagia, puede provocar la muerte de la célula por un mecanismo regulado, como, por ejemplo, cuando en una situación de estrés se induce BNIP3 (Azad et al. 2008). Nosotros hemos mostrado por primera vez que la mitofagia puede llegar a ser un proceso global que abarque a todas las mitocondrias como puede observarse en las imágenes de microscopía confocal de colocación de DsRed2mito y GFP-LC3 ([Figura 36](#)). Con lo cual se demuestra que la mitofagia puede ser muy efectiva para matar las células cuando hay una estimulación de autofagia con una fase degradativa muy activa. Esta conclusión, en la cual la mitofagia es la responsable del proceso de muerte, se corroboró por el rescate de la muerte y del potencial mitocondrial que se observó tras el bloqueo de la degradación por inhibición de la función lisosomal con cloruro de amonio ([Figura 36C y D](#)).

A pesar del debate sobre la existencia de muerte celular mediada por vacuolas autofágicas, nosotros mostramos en este trabajo varios datos que apoyan esta hipótesis. Hemos observado que en el sistema *lis/lin/GO* existe una implicación de las dos fases de la macroautofagia, por un lado, hay una inducción de vacuolas autofágicas a tiempos cortos y, por otro lado, la señal de muerte inducida por el estrés oxidativo activa la fase degradativa del proceso. Por lo tanto, si se induce una mitofagia aguda se puede provocar la muerte de las células en una manera dependiente de generación y degradación de vacuolas (Rubinsztein et al. 2009).

A pesar de que nosotros hemos presentado la autofagia como mecanismo de muerte celular, no descartamos que la función primordial de la autofagia sea mediar procesos de restablecimiento de las funciones vitales de la célula (Kroemer y Levine 2008; Levine y Kroemer 2009). Aunque esta doble función de la autofagia hace que la inducción de muerte por esta vía pueda ser considerada una estrategia para el diseño de nuevas terapias antitumorales, ya que las rutas de autofagia no pueden ser bloqueadas por completo por su importante papel en supervivencia. A este respecto, en determinados tumores, por ejemplo, se ha encontrado que sólo tienen mutado un

alelo del gen de beclina 1 (Qu et al. 2003), lo que provoca simplemente un descenso de los niveles de vacuolas autofágicas pero no el bloqueo total de la función, ya que la función pro-supervivencia de la autofagia es imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia de la célula tumoral. La autofagia en su faceta pro-supervivencia permite la generación de ATP, reduce el estrés oxidativo y disipa el estrés metabólico, lo que confiere a las células tumorales una gran resistencia a la mayoría de las terapias de activación de caspasas, como la radioterapia o los quimioterapéuticos. En el sistema de muerte descrito en este trabajo, la generación de vacuolas tiene la capacidad de enmascarar completamente la activación de caspasas. Así, se podrían diseñar nuevas estrategias antitumorales provocando la desestabilización de la autofagia, bloqueando su función pro-supervivencia, lo que acarrearía una catástrofe metabólica que sensibilizaría a las células tumorales a la muerte (Jin et al. 2007).

Autofagia, mitofagia y muerte celular

El sistema presentado en este trabajo tiene la característica de que la muerte asociada que induce es distinta de los mecanismos comunes que implican activación de caspasas o de algunos otros independientes de caspasas.

Aunque el debate sobre la existencia de muerte por autofagia se basa en que se ha demostrado que ésta no está implicada en la muerte celular programada en el desarrollo de un organismo (Qu et al. 2007). Principalmente, debido a que los cuerpos embrionarios de los ratones deficientes en *atg5* o *beclina1* acumulan células muertas, pero no es causado por un bloqueo de la muerte celular sino por una falta de eliminación de las células apoptóticas por presentar defectos en la externalización de fosfatidilserina por la falta de ATP. Por otro lado, varios expertos han sugerido que para demostrar que en determinados procesos se induce muerte autofágica, es necesario demostrar una serie de premisas (Kroemer y Levine 2008; White 2008): (1) que la muerte sea acompañada de un perfil con vacuolas autofágicas, (2) que ésta pueda ser suprimida por RNA de interferencia de proteínas de la vía de autofagia e inhibidores químicos específicos de esta vía y (3) habría que validarla *in vivo* en condiciones fisiológicas.

A este respecto, nosotros mostramos que cuando se genera un daño severo en las mitocondrias de células tumorales mediante agentes tóxicos, como *lis/lin/GO*, se puede inducir la muerte de las células y ésta puede ser bloqueada por la inhibición de la formación de vacuolas mediante el RNAi de *atg5* o 3-metiladenina o por la inhibición de los lisosomas con bafilomicina A1 y cloruro de amonio. Pero el hecho más relevante es que estos resultados pueden ser extendidos a un modelo de xenotransplante de tumor humano en ratón, donde la inhibición de la generación de vacuolas mediante el RNA

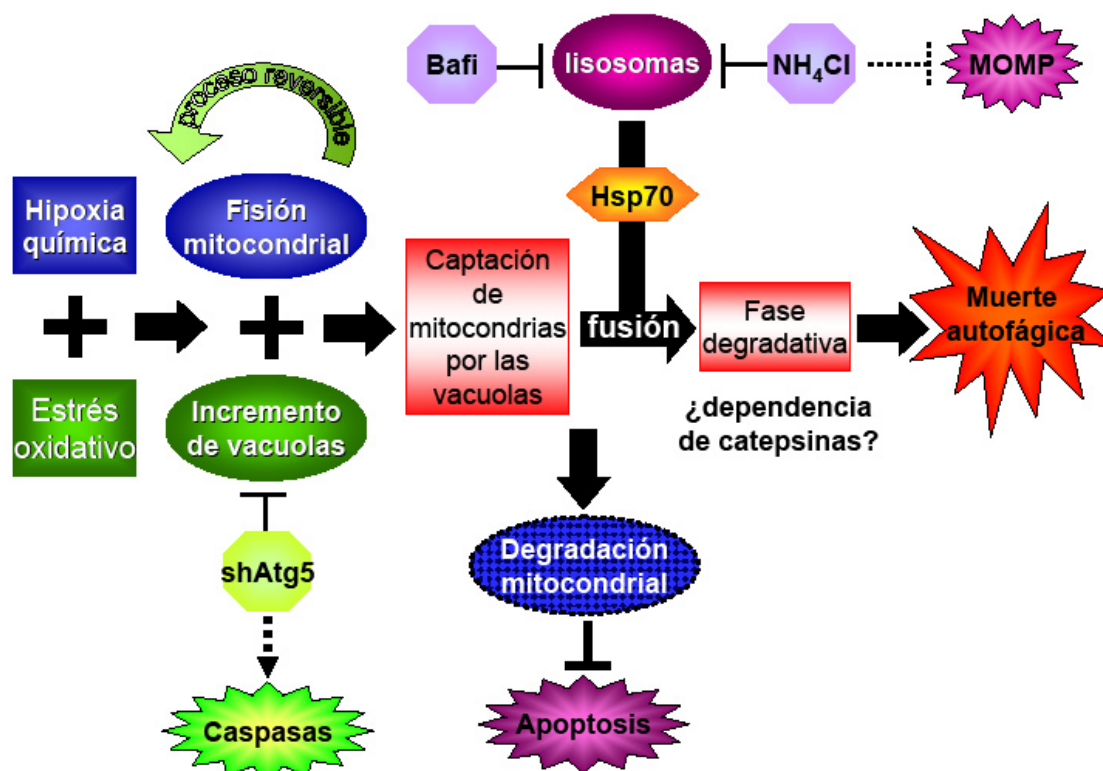


Figura 44. Esquema representativo de los resultados observados en este trabajo. La estimulación de daño mitocondrial, induce la generación de vacuolas autofágicas, las cuales puede enmascarar la activación de caspasas. En este punto, la participación de los lisosomas es necesaria para que la mitofagia sea la responsable de la ejecución de muerte por autofagia. Por otro lado, un regulador clave de esta muerte parece ser la Hsp70, que podría jugar un papel fundamental en la inducción de determinadas características de la muerte necrótica.

de interferencia de *atg5* es capaz de bloquear completamente la muerte inducida por la acción terapéutica del sistema *lis/lin/GO*.

Además, hemos comprobado que la inhibición de *atg5* afecta el crecimiento tumoral, ya que, como es de esperar, el bloqueo de la generación de vacuolas autofágicas puede acarrear estrés metabólico, acumulación de daño al DNA, una ineficiente protección frente al estrés oxidativo o incluso una disminución en la producción de ATP por el reciclaje de componentes celulares. Ahora, gran parte del éxito obtenido en el bloqueo de la inducción de autofagia *in vivo*, es debido a la gran eficiencia de inhibición del RNAi de *atg5* en nuestros modelos. Por ello, descartamos que el bloqueo del efecto terapéutico observado al inhibir *atg5* sea debido a alguno de los efectos secundarios mencionados ligados a la inhibición de autofagia, sino que se debe a un bloqueo específico del mecanismo de muerte implicado. En el diseño de nuestros experimentos, para evitar una posible inducción de las caspasas por la inhibición de

atg5, evaluamos una serie de RNAs de interferencia contra *atg5* y para el bloqueo de autofagia utilizamos el interferente que restablece los niveles de LC3II al nivel basal de las células, el denominado sh40. Este RNAi bloquea solamente la inducción de vacuolas autofágicas, pero permite mantener los niveles basales de vacuolas autofágicas, sin generar un daño excesivo en la célula (Figura 34B). A pesar de esto, genera una fuerte inhibición del crecimiento del tumor, como se evidencia comparando el crecimiento de los tumores sin tratar en la Figura 37A y B. Esto pone de manifiesto la importancia del mantenimiento de los mecanismos de inducción de autofagia en el desarrollo del tumor.

Autofagia, apoptosis y tumorigénesis desencadenada por oncogenes

Un aspecto muy evidente sobre los tumores es que se desarrollan en un ambiente poco favorable debido a la hipoxia y la falta de nutrientes, por lo que están sometidos a una presión selectiva que favorece una serie de modificaciones genéticas. Éstas permiten la reprogramación de las células a nuevos fenotipos adquiridos más adaptados a la situación. Estas mutaciones implican cambios fundamentales en la regulación de procesos metabólicos, en la tasa de proliferación o en la capacidad de inducción de muerte celular comúnmente guiada por la inestabilidad cromosómica. Se han descrito muchas modificaciones celulares que han sido validadas para el desarrollo del cáncer, pero una de las premisas fundamentales observada en la mayoría de los tumores es el aumento de las señales de supervivencia o las modificaciones que llevan al bloqueo de la inducción de caspasas, que impiden la muerte de estas células.

Los mecanismos de inducción de autofagia no escapan a las modificaciones generales descritas para el cáncer que reprograman los principales procesos biológicos, como la capacidad de facilitar la muerte, la proliferación, el metabolismo y el envejecimiento, ya que estos procesos están estrechamente relacionados con la autofagia. En general las células tumorales presentan una sobre-activación de las vías que permiten la estimulación de la maquinaria de generación de vacuolas (Maiuri et al. 2008), por lo que presumiblemente éstas tienen un umbral más bajo para la ejecución de muerte autofágica (Chen et al. 2008). La importancia de este aspecto se demuestra en la dependencia de las células tumorales de la autofagia y su estrecha relación con la generación de protección celular y la inducción de necrosis. Esto quedó reflejado en los experimentos publicados por el grupo de Eileen White en los que células tumorales que tienen bloqueadas las vías de las caspasas y la simultánea inhibición de la autofagia provocaba una inducción de la necrosis, lo que favorecía el crecimiento del tumor. La

explicación más sencilla es que la necrosis generada en esta situación puede inducir inflamación, lo que provoca un aumento en la angiogénesis (Degenhardt et al. 2006). Cuando las células presentan defectos en la inducción de autofagia, o incluso la pérdida parcial de la función de *beclina 1*, se puede producir un aumento de estrés oxidativo, de proteínas como p62, de daño en las mitocondrias o en el genoma. Cuando falla la inducción de autofagia y se produce una acumulación de p62 se induce la activación de NF κ B y, en consecuencia, se promueve la tumorigénesis (Mathew et al. 2009). Aunque esta es una situación particular ocurre cuando el tumor se origina y desarrolla en ausencia de un alelo de *beclina 1*, éste es uno de los pocos genes relacionados con autofagia cuya mutación se ha encontrado en un porcentaje del 40 a 75 % de carcinomas de mama y ovario (Liang et al. 1999).

En este trabajo también se ha mostrado que cuando utilizamos células que son deficientes para caspasa 9 o Bax/Bak e inducimos un daño mitocondrial, se desencadena una muerte por autofagia. Esto concuerda con datos previos en los que la inducción de daño al DNA generado en ausencia de Bax/Bak o caspasas, provoca un daño celular que conduce a autofagia (Shimizu et al. 2004). Nuestros resultados muestran que, cuando las células son tratadas con cianuro y peróxido de hidrógeno, se produce una muerte autofágica tanto en los MEFs de genotipo salvaje, como en los deficientes en caspasa 9 y Bax/Bak, descartando la participación de los principales genes de inducción de apoptosis en esta muerte inducida por daño mitocondrial.

Estos resultados y otros publicados por otros grupos, en los cuales la inhibición de autofagia induce muerte apoptótica o en los que la rapamicina, siendo un inductor de autofagia, protege de la activación de caspasas cuando se induce muerte por apoptosis (Gonzalez-Polo et al. 2005; Ravikumar et al. 2006), podrían demostrar que ambas muertes compiten y una puede actuar en contra de la otra. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, la estrecha relación entre apoptosis y autofagia podría ejercer un efecto importante en determinados sistemas de muerte. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los inductores de daño al DNA pueden actuar como inductores de autofagia. Esto posiblemente es debido a que, cuando se genera daño al DNA, también se produce estrés oxidativo y la inducción de autofagia puede proteger de la activación de apoptosis, lo que actúa como un sistema adicional en la resistencia a quimioterapéuticos (Katayama et al. 2007).

La existencia de muerte por autofagia ha sido cuestionada recientemente, en gran medida porque los ejecutores de este tipo de muerte aún no se conocen (Kroemer y Levine 2008; Levine y Kroemer 2009). Sin embargo, cada vez existen más evidencias que demuestran que, aunque inicialmente la autofagia se induce para preservar la

vida de la célula, la maquinaria de autofagia puede degradar componentes esenciales para ésta, desencadenando la muerte (Kanzawa et al. 2005; Tracy et al. 2007; Tracy y Macleod 2007; Salazar et al. 2009). En el sistema *lis/lin/GO*, el bloqueo de la cadena respiratoria combinado con concentraciones subtóxicas de estrés oxidativo genera una completa mitofagia que acaba provocando la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial lo que conduce irreversiblemente a la muerte celular.

La doble función de la autofagia, que permite tanto la supresión como la supervivencia tumoral (Qu et al. 2003; Degenhardt et al. 2006; Mathew et al. 2007), hace que no se pueda dibujar fácilmente una clara y completa relación entre la autofagia y el cáncer. Por tanto, serán necesarios más estudios para explicar el papel que juega la autofagia en el desarrollo del tumor. A pesar de esta controversia, un aspecto que está muy establecido es que las células tumorales son sensibles tanto al bloqueo (Amaravadi et al. 2007; Maclean et al. 2008) como a la estimulación de autofagia (Kanzawa et al. 2005; Chang et al. 2007; Garcia-Escudero et al. 2008). Aunque ya se había demostrando anteriormente que las células tumorales eran sensibles a la muerte por autofagia (Chen et al. 2008), nosotros quisimos demostrar en este trabajo que los procesos tumorales causados por genes como *c-myc* o *ras* (HrasV12) (Kim et al. 2002; Amaravadi et al. 2007; Datta et al. 2007) sensibilizan a las células a morir por autofagia cuando son tratadas con *lis/lin/GO*. Además, nosotros mostramos que los oncogenes como *c-myc* y *ras* pueden modificar la actividad de la AMPK, lo que conduce

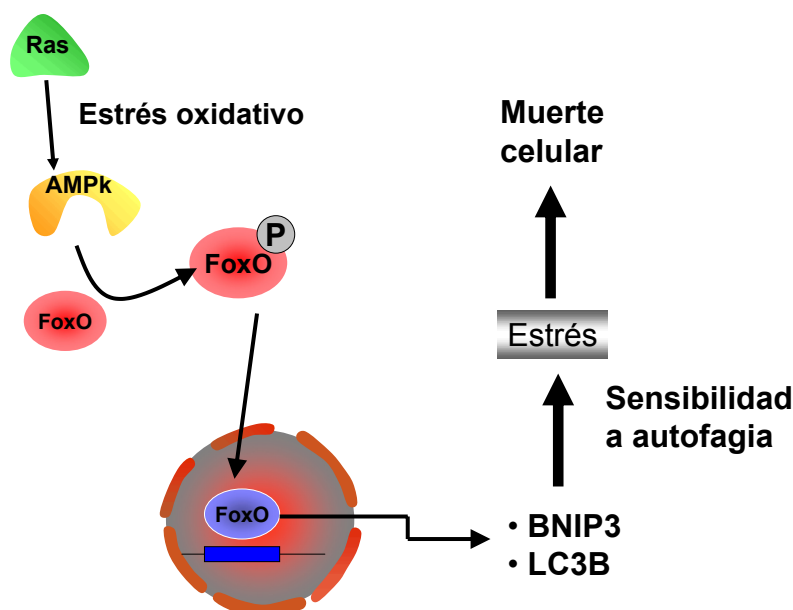


Figura 45. Esquema de la posible implicación de AMPK-FoxO3 en la sensibilidad a la muerte autofágica en el modelo de oncogénesis medada por *ras* y *c-myc*.

a la activación de genes fundamentales para la mitofagia como BNIP3 y LC3B. Se ha descrito que la AMPK podría promover la activación transcripcional de FoxO3 mediante su fosforilación en los residuos ser413 y ser588 (Greer et al. 2007), lo que provocaría la inducción de los genes BNIP3 y LC3B, según el tipo y el contexto celular (Mammucari et al. 2007; Zhao et al. 2007). Aquí, es evidente que esta vía también opera en la muerte celular autofágica inducida por *l*is/*l*in/*G*O (Figura 45). Aunque sólo se ha presentado la estimulación de autofagia en los modelos oncogénicos mediados por *c-myc* y *ras*, este efecto también ha sido observado utilizando otros oncogenes o proteínas implicadas en el desarrollo o progresión tumoral, demostrándose un incremento de la autofagia ligada al crecimiento del tumor (Lu et al. 2008; Turcotte et al. 2008; Weihua et al. 2008; Yogalingam y Pendergast 2008). En conclusión, en el presente trabajo se propone que un alto porcentaje de los tumores podrían ser sensibles a la muerte mediada por autofagia.

conclusiones

1. El sistema linamarina/linamarasa/GO ha demostrado su eficacia para matar células tumorales lo que implica el bloqueo de la progresión de tumores humanos en un modelo de xenotransplante en ratones inmunodeficientes.
2. La evaluación morfológica de la muerte asociada al sistema terapéutico *lis/lin/GO* muestra distintos perfiles de muerte celular que conllevan el mantenimiento o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática.
3. El análisis molecular de la muerte inducida por el sistema *lis/lin/GO* refleja la participación de la chaperona Hsp70 en la muerte celular, lo que podría implicar un papel pro-muerte novedoso para esta proteína.
4. El estrés generado por el sistema de muerte provoca una disfunción mitocondrial con pérdida de su patrón filamentoso.
5. El estudio detallado de la muerte muestra una independencia de los mecanismos tradicionales que operan en una situación gobernada por estrés oxidativo, ya que es independiente de caspasas, Bax/Bak, AIF y PARP1.
6. La terapia *lis/lin/GO* induce la formación de vacuolas autofágicas que están involucradas en la muerte que se genera.
7. La inducción de autofagia en el sistema *lis/lin/GO* en W&W y U-87 MG está asociada a una mitofagia generalizada y una fase degradativa que depende estrictamente de los lisosomas.
8. La eficiencia de la terapia antitumoral en modelo de xenotransplante de tumores humanos depende de la inducción de autofagia.
9. Las vacuolas autofágicas tienen la capacidad de bloquear la inducción de caspasas a nivel mitocondrial revelando la estrecha relación existente entre apoptosis y autofagia
10. La tumorigenesis mediada por oncogenes sensibiliza a las células a la inducción de autofagia en un proceso dependiente de AMPK y FoxO3.

bibliografía

- Althaus, F.R., Kleczkowska, H.E., Malanga, M., Muntener, C.R., Pleschke, J.M., Ebner, M., y Auer, B. 1999. Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol Cell Biochem* **193**(1-2): 5-11.
- Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I., Thomas-Tikhonenko, A., y Thompson, C.B. 2007. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* **117**(2): 326-336.
- Amenta, J.S., Hlivko, T.J., McBee, A.G., Shinozuka, H., y Brocher, S. 1978. Specific inhibition by NH₄Cl of autophagy-associated proteolysis in cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* **115**(2): 357-366.
- Andrews, D.W., Resnicoff, M., Flanders, A.E., Kenyon, L., Curtis, M., Merli, G., Baserga, R., Iliakis, G., y Aiken, R.D. 2001. Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *J Clin Oncol* **19**(8): 2189-2200.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F., y Youle, R.J. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* **22**(17): 4385-4399.
- Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J., y Ameisen, J.C. 2002. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* **159**(6): 923-929.
- Arya, R., Mallik, M., y Lakhotia, S.C. 2007. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* **32**(3): 595-610.
- Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J., y Gibson, S.B. 2008. Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* **4**(2): 195-204.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., y Korsmeyer, S.J. 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**(3): 899-906.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., y Rich, J.N. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**(7120): 756-760.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., y Campisi, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* **22**(16): 4212-4222.
- Beckman, G., Beckman, L., Ponten, J., y Westermarck, B. 1971. G-6-PD and PGM phenotypes of 16 continuous human tumor cell lines. Evidence against cross-contamination and contamination by HeLa cells. *Hum Hered* **21**(3): 238-241.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., y Green, D.R. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**(8): 469-475.

- Belzacq, A.S., Vieira, H.L., Kroemer, G., y Brenner, C. 2002. The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie* **84**(2-3): 167-176.
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F., y Forte, M. 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* **26**(2): 112-117.
- Bleau, A.M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., y Holland, E.C. 2009. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* **4**(3): 226-235.
- Bouchier-Hayes, L., Lartigue, L., y Newmeyer, D.D. 2005. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* **115**(10): 2640-2647.
- Bouillet, P. y Strasser, A. 2002. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**(Pt 8): 1567-1574.
- Bowman, E.J., Siebers, A., y Altendorf, K. 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 7972-7976.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jaattela, M., y Kroemer, G. 2003. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* **197**(10): 1323-1334.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., y Kroemer, G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**(3): 1025-1040.
- Boya, P. y Kroemer, G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**(50): 6434-6451.
- Bustin, M. 2002. At the crossroads of necrosis and apoptosis: signaling to multiple cellular targets by HMGB1. *Sci STKE* 2002(**151**): PE39.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., y Reeves, W.J., Jr. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* **53**(3): 661-674.
- Capranico, G. y Binaschi, M. 1998. DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim Biophys Acta* **1400**(1-3): 185-194.
- Cilenti, L., Soundarapandian, M.M., Kyriazis, G.A., Stratico, V., Singh, S., Gupta, S., Bonventre, J.V., Alnemri, E.S., y Zervos, A.S. 2004. Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death. *J Biol Chem* **279**(48): 50295-50301.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L., y De Strooper, B. 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**(1): 163-175.
- Clement, M.V., Ponton, A., y Pervaiz, S. 1998. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of

- intracellular milieu. *FEBS Lett* **440**(1-2): 13-18.
- Colell, A., Ricci, J.E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N.J., Li, C.W., Mari, B., Barbry, P., Newmeyer, D.D., Beere, H.M., y Green, D.R. 2007. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* **129**(5): 983-997.
- Cortes, M.L., de Felipe, P., Martin, V., Hughes, M.A., y Izquierdo, M. 1998. Successful use of a plant gene in the treatment of cancer in vivo. *Gene Ther* **5**(11): 1499-1507.
- Cortes, M.L., Garcia-Escudero, V., Hughes, M., y Izquierdo, M. 2002. Cyanide bystander effect of the linamarase/linamarin killer-suicide gene therapy system. *J Gene Med* **4**(4): 407-414.
- Cory, S. y Adams, J.M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**(9): 647-656.
- Cregan, S.P., Dawson, V.L., y Slack, R.S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **23**(16): 2785-2796.
- Chang, C.P., Yang, M.C., Liu, H.S., Lin, Y.S., y Lei, H.Y. 2007. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* **45**(2): 286-296.
- Chen, Y. y Gibson, S.B. 2008. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy* **4**(2): 246-248.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., y Gibson, S.B. 2007. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* **120**(Pt 23): 4155-4166.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., y Gibson, S.B. 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* **15**(1): 171-182.
- Chipuk, J.E. y Green, D.R. 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 268-275.
- Dai, Y. y Grant, S. 2007. Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery. *Cancer Res* **67**(7): 2908-2911.
- Daido, S., Kanzawa, T., Yamamoto, A., Takeuchi, H., Kondo, Y., y Kondo, S. 2004. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* **64**(12): 4286-4293.
- Datta, S., Hoenerhoff, M.J., Bommi, P., Sainger, R., Guo, W.J., Dimri, M., Band, H., Band, V., Green, J.E., y Dimri, G.P. 2007. Bmi-1 cooperates with H-Ras to transform human mammary epithelial cells via dysregulation of multiple growth-regulatory pathways. *Cancer Res* **67**(21): 10286-10295.
- Daugaard, M., Jaattela, M., y Rohde, M. 2005. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* **4**(7): 877-880.
- Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., y Kroemer, G. 2000. Mitochondrio-

- nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* **14**(5): 729-739.
- Debnath, J., Muthuswamy, S.K., y Brugge, J.S. 2003. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**(3): 256-268.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C., Fan, Y., Nelson, D.A., Jin, S., y White, E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**(1): 51-64.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernsheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A., y Yuan, J. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* **4**(5): 313-321.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., y Yuan, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**(2): 112-119.
- Diehn, M. y Clarke, M.F. 2006. Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J Natl Cancer Inst* **98**(24): 1755-1757.
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M.J., Wapnir, I., Dirbas, F.M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S.K., Quake, S.R., Brown, J.M., Weissman, I.L., y Clarke, M.F. 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* **458**(7239): 780-783.
- Dirks, P.B. 2006. Cancer: stem cells and brain tumours. *Nature* **444**(7120): 687-688.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., y Naldini, L. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**(11): 8463-8471.
- Ellis, H.M. y Horvitz, H.R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**(6): 817-829.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., y Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Eskelinen, E.L. 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**(1): 1-10.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., y Herman, J.G. 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**(19): 1350-1354.
- Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Kirkegaard-Sorensen, T., Rafn, B., Bottzauw, T., Nielsen, C., Weber, E., Shirasawa, S., Kallunki, T., y Jaattela, M. 2008. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer Res* **68**(16): 6623-6633.

- Festjens, N., Vanden Berghe, T., y Vandenabeele, P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1371-1387.
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., y Tschachler, E. 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **293**(2): 722-726.
- Fischer, U., Janicke, R.U., y Schulze-Osthoff, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**(1): 76-100.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., y Youle, R.J. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**(4): 515-525.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., y Scorrano, L. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**(1): 177-189.
- Fu, Z. y Tindall, D.J. 2008. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* **27**(16): 2312-2319.
- Galonek, H.L. y Hardwick, J.M. 2006. Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol* **8**(12): 1317-1319.
- Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M.L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Jaattela, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, S.A., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.C., Martin, S.J., Medema, J.P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U.M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D.W., Nicotera, P., Nunez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H.U., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Voutsden, K.H., Youle, R.J., Yuan, J., Zhivotovsky, B., y Kroemer, G. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*.
- Garcia-Escudero, V. y Gargini, R. 2008. Autophagy induction as an efficient strategy to eradicate tumors. *Autophagy* **4**(7): 923-925.
- Garcia-Escudero, V., Gargini, R., y Izquierdo, M. 2008. Glioma regression in vitro and in vivo by a suicide combined treatment. *Mol Cancer Res* **6**(3): 407-417.
- Gonzalez-Polo, R.A., Boya, P., Pauleau, A.L., Jalil, A., Larochette, N., Souquere, S., Eskelinen, E.L., Pierron, G., Saftig, P., y Kroemer, G. 2005. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* **118**(Pt 14): 3091-3102.
- Green, D.R. y Kroemer, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death.

- Science **305**(5684): 626-629.
- Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., y Brunet, A. 2007. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem* **282**(41): 30107-30119.
- Gronbaek, K. y Jaattela, M. 2009. Engaging the lysosomal compartment to combat B cell malignancies. *J Clin Invest* **119**(8): 2133-2136.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J., y Holland, E.C. 2008a. Cancer stem cells and survival pathways. *Cell Cycle* **7**(10): 1371-1378.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J., Rosenblum, M.K., Pandolfi, P.P., Manova-Todorova, K., y Holland, E.C. 2008b. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev* **22**(4): 436-448.
- Hartley, A., Stone, J.M., Heron, C., Cooper, J.M., y Schapira, A.H. 1994. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* **63**(5): 1987-1990.
- Heeres, J.T. y Hergenrother, P.J. 2007. Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol* **11**(6): 644-653.
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., y Stupp, R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**(10): 997-1003.
- Hemann, M.T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J.A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J.L., Tansey, W.P., y Lowe, S.W. 2005. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* **436**(7052): 807-811.
- Herrero-Martin, G., Hoyer-Hansen, M., Garcia-Garcia, C., Fumarola, C., Farkas, T., Lopez-Rivas, A., y Jaattela, M. 2009. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *Embo J* **28**(6): 677-685.
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., y Yuan, J. 2008. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* **135**(7): 1311-1323.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R.D., y Korsmeyer, S.J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**(6299): 334-336.
- Hobbs, S., Jitrapakdee, S., y Wallace, J.C. 1998. Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1alpha promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **252**(2): 368-372.
- Hunt, C. y Morimoto, R.I. 1985. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(19): 6455-6459.

- Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J.C., y Perucho, M. 2000. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 10872-10877.
- Ivanov, A., Beers, S.A., Walshe, C.A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K.L., Potter, K.N., Murray, S., Chan, C.H., Klymenko, T., Erenpreisa, J., Glennie, M.J., Illidge, T.M., y Cragg, M.S. 2009. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest* **119**(8): 2143-2159.
- Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., y Eskelinen, E.L. 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**(Pt 20): 4837-4848.
- James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., y Martinou, J.C. 2003. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**(38): 36373-36379.
- Jiang, X. y Wang, X. 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* **275**(40): 31199-31203.
- Jin, S., DiPaola, R.S., Mathew, R., y White, E. 2007. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* **120**(Pt 3): 379-383.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., y Yoshimori, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* **19**(21): 5720-5728.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I.M., Kondo, Y., y Kondo, S. 2005. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* **24**(6): 980-991.
- Karbowski, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., y Youle, R.J. 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* **159**(6): 931-938.
- Katayama, M., Kawaguchi, T., Berger, M.S., y Pieper, R.O. 2007. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* **14**(3): 548-558.
- Kaufman, R.J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**(10): 1211-1233.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., y Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Kim, H., Farris, J., Christman, S.A., Kong, B.W., Foster, L.K., O'Grady, S.M., y Foster, D.N. 2002. Events in the immortalizing process of primary human mammary epithelial cells by the catalytic subunit of human telomerase. *Biochem J* **365**(Pt 3): 765-772.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., y Cheng, E.H. 2006a. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by

- BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* **8**(12): 1348-1358.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., y Lemasters, J.J. 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 245-253.
- Kim, J.S., He, L., y Lemasters, J.J. 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3): 463-470.
- Kim, J.W., Closs, E.I., Albritton, L.M., y Cunningham, J.M. 1991. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* **352**(6337): 725-728.
- Kim, S.J., Zhang, Z., Hitomi, E., Lee, Y.C., y Mukherjee, A.B. 2006b. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet* **15**(11): 1826-1834.
- Klionsky, D.J., Elazar, Z., Seglen, P.O., y Rubinsztein, D.C. 2008. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* **4**(7): 849-950.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., y Wallace, D.C. 2004. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**(6973): 461-465.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., y Kondo, S. 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* **5**(9): 726-734.
- Kondo, Y. y Kondo, S. 2006. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy* **2**(2): 85-90.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., y Melino, G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., y Melino, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**(1): 3-11.
- Kroemer, G. y Jaattela, M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* **5**(11): 886-897.
- Kroemer, G. y Levine, B. 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 1004-1010.
- Kroemer, G. y Martin, S.J. 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med* **11**(7): 725-730.
- Kroemer, G. y Pouyssegur, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13**(6): 472-482.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhi, T., y Mizushima, N. 2004. The role of autophagy during the early

- neonatal starvation period. *Nature* **432**(7020): 1032-1036.
- Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A., Jr., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., y Flavell, R.A. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* **311**(5762): 847-851.
- Lamparska-Przybysz, M., Gajkowska, B., y Motyl, T. 2005. Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. *J Physiol Pharmacol* **56 Suppl 3**: 159-179.
- Le Bras, M., Clement, M.V., Pervaiz, S., y Brenner, C. 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* **20**(1): 205-219.
- Lechardeur, D., Drzymala, L., Sharma, M., Zylka, D., Kinach, R., Pacia, J., Hicks, C., Usmani, N., Rommens, J.M., y Lukacs, G.L. 2000. Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol* **150**(2): 321-334.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., y Youle, R.J. 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15**(11): 5001-5011.
- Lee, Y.J. y Shacter, E. 1999. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* **274**(28): 19792-19798.
- Lee, Y.J. y Shacter, E. 2000. Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspase-3 in vivo. *Free Radic Biol Med* **29**(7): 684-692.
- Lemasters, J.J. 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* **8**(1): 3-5.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., y Herman, B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1366**(1-2): 177-196.
- Lengauer, C., Diaz, L.A., Jr., y Saha, S. 2005. Cancer drug discovery through collaboration. *Nat Rev Drug Discov* **4**(5): 375-380.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., y Colman, P.M. 2008. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **7**(12): 989-1000.
- Levine, B. y Klionsky, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**(4): 463-477.
- Levine, B. y Kroemer, G. 2009. Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ* **16**(1): 1-2.
- Li, D., Duan, L., Freimuth, P., y O'Malley, B.W., Jr. 1999. Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **5**(12): 4175-4181.
- Li, L.Y., Luo, X., y Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**(6842): 95-99.

- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., y Robinson, J.P. 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* **278**(10): 8516-8525.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., y Levine, B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**(6762): 672-676.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R., y Thompson, C.B. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**(6): 1389-1399.
- Lopez-Otin, C. y Matrisian, L.M. 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **7**(10): 800-808.
- Lou, H. y Dean, M. 2007. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* **26**(9): 1357-1360.
- Lu, Z., Luo, R.Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G.B., Liao, W.S., y Bast, R.C., Jr. 2008. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* **118**(12): 3917-3929.
- Luke, C.J., Pak, S.C., Askew, Y.S., Naviglia, T.L., Askew, D.J., Nobar, S.M., Vetica, A.C., Long, O.S., Watkins, S.C., Stolz, D.B., Barstead, R.J., Moulder, G.L., Bromme, D., y Silverman, G.A. 2007. An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury. *Cell* **130**(6): 1108-1119.
- Lyamzaev, K.G., Izyumov, D.S., Avetisyan, A.V., Yang, F., Pletjushkina, O.Y., y Chernyak, B.V. 2004a. Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim Pol* **51**(2): 553-562.
- Lyamzaev, K.G., Pletjushkina, O.Y., Saprunova, V.B., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., y Skulachev, V.P. 2004b. Selective elimination of mitochondria from living cells induced by inhibitors of bioenergetic functions. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 6): 1070-1071.
- Ma, W.W. y Adjei, A.A. 2009. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin* **59**(2): 111-137.
- Maclean, K.H., Dorsey, F.C., Cleveland, J.L., y Kastan, M.B. 2008. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis. *J Clin Invest* **118**(1): 79-88.
- Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., y Kroemer, G. 2008. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ*.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., y Kroemer, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 741-752.

- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A.L., Schiaffino, S., y Sandri, M. 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**(6): 458-471.
- Marcellus, R.C., Lavoie, J.N., Boivin, D., Shore, G.C., Ketner, G., y Branton, P.E. 1998. The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis. *J Virol* **72**(9): 7144-7153.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., y Kroemer, G. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**(5385): 2027-2031.
- Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., Dipaola, R.S., Karantza-Wadsworth, V., y White, E. 2009. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**(6): 1062-1075.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., y White, E. 2007. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* **21**(11): 1367-1381.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., y Korsmeyer, S.J. 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**(1): 79-88.
- Mellor, H.R. y Harris, A.L. 2007. The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **26**(3-4): 553-566.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., y Klionsky, D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**(7182): 1069-1075.
- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K., y Knuutila, S. 1997. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **90**(3): 1168-1174.
- Montecucco, A. y Biamonti, G. 2007. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* **252**(1): 9-18.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., y Yasuhiko, Y. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* **277**(37): 34287-34294.
- Morgenstern, J.P. y Land, H. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**(12): 3587-3596.
- Morrison, S.J. y Kimble, J. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**(7097): 1068-1074.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., y Yuan, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**(6765): 98-103.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., y Youle, R.J. 2008. Parkin is recruited selectively

- to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**(5): 795-803.
- Nikiforov, M.A., Riblett, M., Tang, W.H., Gratchouck, V., Zhuang, D., Fernandez, Y., Verhaegen, M., Varambally, S., Chinnaiyan, A.M., Jakubowiak, A.J., y Soengas, M.S. 2007. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19488-19493.
- Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J.P., y Korsmeyer, S.J. 1990. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* **144**(9): 3602-3610.
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., y Jaattela, M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* **200**(4): 425-435.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lutolf, U.M., y Kleihues, P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **64**(19): 6892-6899.
- Ohgaki, H. y Kleihues, P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170**(5): 1445-1453.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., y Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**(4): 609-619.
- Park, H.S., Lee, J.S., Huh, S.H., Seo, J.S., y Choi, E.J. 2001. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J* **20**(3): 446-456.
- Park, K.J., Lee, S.H., Lee, C.H., Jang, J.Y., Chung, J., Kwon, M.H., y Kim, Y.S. 2009. Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **382**(4): 726-729.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., y Xue, D. 2001. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**(6842): 90-94.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., y Baltimore, D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8392-8396.
- Perfettini, J.L., Roumier, T., y Kroemer, G. 2005. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* **15**(4): 179-183.
- Phillips, T.M., McBride, W.H., y Pajonk, F. 2006. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* **98**(24): 1777-1785.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., y Althaus, F.R. 2000. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* **275**(52): 40974-40980.
- Pletjushkina, O.Y., Lyamzaev, K.G., Popova, E.N., Nepryakhina, O.K., Ivanova, O.Y., Domnina, L.V., Chernyak, B.V., y Skulachev, V.P. 2006. Effect of oxidative stress

- on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1757**(5-6): 518-524.
- Ponten, J. y Macintyre, E.H. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**(4): 465-486.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., y Gabai, V.L. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* **283**(1): 1-16.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., y Levine, B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**(12): 1809-1820.
- Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., y Levine, B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* **128**(5): 931-946.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C., y Perucho, M. 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**(5302): 967-969.
- Rao, R.V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del Rio, G., Bredesen, D.E., y Ellerby, H.M. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* **277**(24): 21836-21842.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., y Kroemer, G. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* **3**(9): 839-843.
- Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J., y Rubinsztein, D.C. 2006. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum Mol Genet* **15**(7): 1209-1216.
- Rohde, M., Daugaard, M., Jensen, M.H., Helin, K., Nylandsted, J., y Jaattela, M. 2005. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* **19**(5): 570-582.
- Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., y Klionsky, D.J. 2009. In search of an "autophagometer". *Autophagy* **5**(5): 585-589.
- Ruiz-Vela, A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., y Korsmeyer, S.J. 2005. Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases. *EMBO Rep* **6**(4): 379-385.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vazquez, P., Blazquez, C., Torres, S., Garcia, S., Nowak, J., Fimia, G.M., Piacentini, M., Cecconi, F., Pandolfi, P.P., Gonzalez-Feria, L., Iovanna, J.L., Guzman, M., Boya, P., y Velasco, G. 2009. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest*.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., y Alnemri, E.S. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* **2**(8): 476-483.
- Scaffidi, P., Misteli, T., y Bianchi, M.E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**(6894): 191-195.

- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., y Korsmeyer, S.J. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**(5616): 135-139.
- Shchepina, L.A., Popova, E.N., Pletjushkina, O.Y., y Chernyak, B.V. 2002. Respiration and mitochondrial membrane potential are not required for apoptosis and anti-apoptotic action of Bcl-2 in HeLa cells. *Biochemistry (Mosc)* **67**(2): 222-226.
- Shim, E.H., Kim, J.I., Bang, E.S., Heo, J.S., Lee, J.S., Kim, E.Y., Lee, J.E., Park, W.Y., Kim, S.H., Kim, H.S., Smithies, O., Jang, J.J., Jin, D.I., y Seo, J.S. 2002. Targeted disruption of hsp70.1 sensitizes to osmotic stress. *EMBO Rep* **3**(9): 857-861.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H., y Tsujimoto, Y. 1996a. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* **13**(1): 21-29.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H., y Tsujimoto, Y. 1996b. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* **12**(10): 2045-2050.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., y Tsujimoto, Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**(12): 1221-1228.
- Shimizu, S., Narita, M., y Tsujimoto, Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**(6735): 483-487.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., y Martin, S.J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **144**(2): 281-292.
- Smulson, M.E., Simbulan-Rosenthal, C.M., Boulares, A.H., Yakovlev, A., Stoica, B., Iyer, S., Luo, R., Haddad, B., Wang, Z.Q., Pang, T., Jung, M., Dritschilo, A., y Rosenthal, D.S. 2000. Roles of poly(ADP-ribosylation) and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1. *Adv Enzyme Regul* **40**: 183-215.
- Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M., y Mosser, D.D. 2005. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* **280**(46): 38729-38739.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., y Mirimanoff, R.O. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**(10): 987-996.
- Suen, D.F., Norris, K.L., y Youle, R.J. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* **22**(12): 1577-1590.

- Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A., Jr., y Shepard, H.M. 1985. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* **230**(4728): 943-945.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M., y Kroemer, G. 1999a. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* **189**(2): 381-394.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., y Kroemer, G. 1999b. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718): 441-446.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., y Takahashi, R. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**(3): 613-621.
- Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J., y Rizzuto, R. 2004. Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca^{2+} waves and protects against Ca^{2+} -mediated apoptosis. *Mol Cell* **16**(1): 59-68.
- Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., Nannmark, U., Samara, C., Pinton, P., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., Moll, U.M., Madeo, F., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., Szabadkai, G., Pierron, G., Blomgren, K., Tavernarakis, N., Codogno, P., Cecconi, F., y Kroemer, G. 2008. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**(6): 676-687.
- Thibodeaux, C.A., Liu, X., Disbrow, G.L., Zhang, Y., Rone, J.D., Haddad, B.R., y Schlegel, R. 2008. immortalization and transformation of human mammary epithelial cells by a tumor-derived Myc mutant. *Breast Cancer Res Treat*.
- Tolkovsky, A.M. 2009. Mitophagy. *Biochim Biophys Acta*.
- Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B.T., Knabb, J.R., Schumacker, P., y Macleod, K.F. 2007. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* **27**(17): 6229-6242.
- Tracy, K. y Macleod, K.F. 2007. Regulation of mitochondrial integrity, autophagy and cell survival by BNIP3. *Autophagy* **3**(6): 616-619.
- Turcotte, S., Chan, D.A., Sutphin, P.D., Hay, M.P., Denny, W.A., y Giaccia, A.J. 2008. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell* **14**(1): 90-102.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., y Shirihai, O.S. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* **27**(2): 433-446.
- Tzung, S.P., Kim, K.M., Basanez, G., Giedt, C.D., Simon, J., Zimmerberg, J., Zhang, K.Y., y Hockenbery, D.M. 2001. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2

- homology domain 3. *Nat Cell Biol* **3**(2): 183-191.
- Ulasov, I.V., Zhu, Z.B., Tyler, M.A., Han, Y., Rivera, A.A., Khramtsov, A., Curiel, D.T., y Lesniak, M.S. 2007. Survivin-driven and fiber-modified oncolytic adenovirus exhibits potent antitumor activity in established intracranial glioma. *Hum Gene Ther* **18**(7): 589-602.
- Van Cruchten, S. y Van Den Broeck, W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* **31**(4): 214-223.
- Van Houdt, W.J., Haviv, Y.S., Lu, B., Wang, M., Rivera, A.A., Ulasov, I.V., Lamfers, M.L., Rein, D., Lesniak, M.S., Siegal, G.P., Dirven, C.M., Curiel, D.T., y Zhu, Z.B. 2006. The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma. *J Neurosurg* **104**(4): 583-592.
- Vande Velde, C., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., Hakem, R., y Greenberg, A.H. 2000. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* **20**(15): 5454-5468.
- Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., y Bond, G.L. 2008. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **7**(12): 979-987.
- Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., y Vandenabeele, P. 1998. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* **188**(5): 919-930.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., y Strasser, A. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**(5647): 1036-1038.
- Wang, R., Wang, X., Li, B., Lin, F., Dong, K., Gao, P., y Zhang, H.Z. 2009. Tumor-specific adenovirus-mediated PUMA gene transfer using the survivin promoter enhances radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* **117**(1): 45-54.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., y Xue, D. 2002. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **298**(5598): 1587-1592.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., y Korsmeyer, S.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517): 727-730.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., y Levine, B. 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**(6): 678-688.
- Weihua, Z., Tsan, R., Huang, W.C., Wu, Q., Chiu, C.H., Fidler, I.J., y Hung, M.C. 2008. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* **13**(5): 385-393.
- White, E. 2007. Role of the metabolic stress responses of apoptosis and autophagy in tumor suppression. *Ernst Schering Found Symp Proc*(4): 23-34.

- White, E. 2008. Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis. *Autophagy* **4**(4): 399-401.
- Widlak, P., Li, L.Y., Wang, X., y Garrard, W.T. 2001. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* **276**(51): 48404-48409.
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., O'Kane, C.J., Floto, R.A., y Rubinsztein, D.C. 2008. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol* **4**(5): 295-305.
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Huang, Q., Ong, C.N., y Shen, H.M. 2009. Activation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway promotes necrotic cell death via suppression of autophagy. *Autophagy* **5**(6): 824-834.
- Xie, Z. y Klionsky, D.J. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**(10): 1102-1109.
- Yaglom, J.A., Gabai, V.L., Meriin, A.B., Mosser, D.D., y Sherman, M.Y. 1999. The function of HSP72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase activation can be dissociated from its role in prevention of protein damage. *J Biol Chem* **274**(29): 20223-20228.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., y Tashiro, Y. 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* **23**(1): 33-42.
- Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., y Du, C. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* **17**(12): 1487-1496.
- Yogalingam, G. y Pendergast, A.M. 2008. Abl kinases regulate autophagy by promoting the trafficking and function of lysosomal components. *J Biol Chem* **283**(51): 35941-35953.
- Yoshioka, A., Yamaya, Y., Saiki, S., Kanemoto, M., Hirose, G., Beesley, J., y Pleasure, D. 2000. Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors mediate oxygen-glucose deprivation-induced oligodendroglial injury. *Brain Res* **854**(1-2): 207-215.
- Youle, R.J. y Karbowski, M. 2005. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 657-663.
- Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., y Narita, M. 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**(7): 798-803.
- Yu, S.F., von Ruden, T., Kantoff, P.W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W.F., Wagner, E.F., y Gilboa, E. 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3194-3198.
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., y Dawson, V.L. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**(5579): 259-

263.

- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., y Kroemer, G. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* **183**(4): 1533-1544.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., y Korsmeyer, S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**(4): 619-628.
- Zhang, J. y Ney, P.A. 2009. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* **16**(7): 939-946.
- Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., y Goldberg, A.L. 2007. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**(6): 472-483.
- Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A.C., Hiller, D.J., Chen, A.J., Perry, S.R., Tonon, G., Chu, G.C., Ding, Z., Stommel, J.M., Dunn, K.L., Wiedemeyer, R., You, M.J., Brennan, C., Wang, Y.A., Ligon, K.L., Wong, W.H., Chin, L., y DePinho, R.A. 2008. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* **455**(7216): 1129-1133.
- Zhivotovsky, B. y Kroemer, G. 2004. Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(9): 752-762.
- Zhu, Z.B., Makhija, S.K., Lu, B., Wang, M., Kaliberova, L., Liu, B., Rivera, A.A., Nettelbeck, D.M., Mahasreshti, P.J., Leath, C.A., Barker, S., Yamaoto, M., Li, F., Alvarez, R.D., y Curiel, D.T. 2004. Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter. *Cancer Gene Ther* **11**(4): 256-262.
- Zong, W.X., Ditsworth, D., Bauer, D.E., Wang, Z.Q., y Thompson, C.B. 2004. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* **18**(11): 1272-1282.
- Zong, W.X. y Thompson, C.B. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* **20**(1): 1-15.